

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 Filter Plates

N° de pedido 57000/F

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.....	5
2.1 Información general.....	5
2.2 Uso previsto.....	6
2.3 Principio del kit de reactivos.....	6
3 Sistema LC-MS/MS	7
3.1 Equipamiento y parámetros del equipo de HPLC	7
3.2 Medición MS/MS	9
3.3 Optimización de las transiciones MRM (tuning)	9
3.4 Puesta en funcionamiento.....	9
3.5 Pausas en el funcionamiento	10
4 Transferencia de masas de los analitos y del estándar interno	10
5 Preparación de la muestra	13
5.1 Obtención y conservación de muestras de pacientes	13
5.2 Reconstitución del estándar interno	14
5.3 Manipulación de los reactivos del Set de ampliación de succinilacetona.....	14
5.4 Manipulación de los controles.....	15
5.5 Proceso de preparación de muestras	16
5.5.1 Preparación de muestras con placa filtrante de 96 pocillos sin succinilacetona.....	16
5.5.2 Preparación de muestras con placa filtrante de 96 pocillos con succinilacetona	17
5.6 Estabilidad de las muestras preparadas.....	18
5.6.1 Muestras preparadas sin succinilacetona	18
5.6.2 Muestras preparadas con succinilacetona	19
6 Equipamiento adicional necesario	19
7 Registro de datos y cálculo	20
8 Control de calidad	20
9 Valores de corte	21
10 Factores de conversión	23
11 Almacenamiento y caducidad de los reactivos.....	24
12 Tratamiento de los residuos.....	24
13 Comprobación de interferencias.....	25
14 Localización y resolución de problemas	28
15 Bibliografía.....	29
Apéndice I: Observaciones sobre las sustancias peligrosas.....	30
Apéndice II: Indicaciones para el cálculo	32
Apéndice III: Datos de validación.....	33
Apéndice IV: Símbolos.....	58

1 Información sobre el pedido

Nº de pedido Producto

57000/F	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 Filter Plates: Mobile Phase 2 x 1000 ml Internal Standard Mix 4 x 50,0 ml (liof.) Rinsing Solution 1 x 1000 ml Extraction Buffer 2 x 100 ml 96 Well Filter Plates 3 x 5 unidades 96 Well Plates, V-bottomed 3 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/F	Succinylacetone (non derivatised) Upgrade Set Contenido del kit para 960 análisis con 96 Well Filter 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/FR	Internal Standard Mix 4 x 50,0 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
57057	96 Well Filter Plates 5 unidades
	Accesorios
57015	Cross-cut Adhesive Seals for 96 Well Plates 10 unidades
55015	Restrictor Capillary 1 unidad
55016	Adapter Collar, for centrifugation 2 unidades
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 diagnosis 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. La extracción de las muestras se realiza en una placa de filtro de la que se pasan los extractos a una placa colectora de forma segura y cómoda mediante un breve centrifugado. 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.

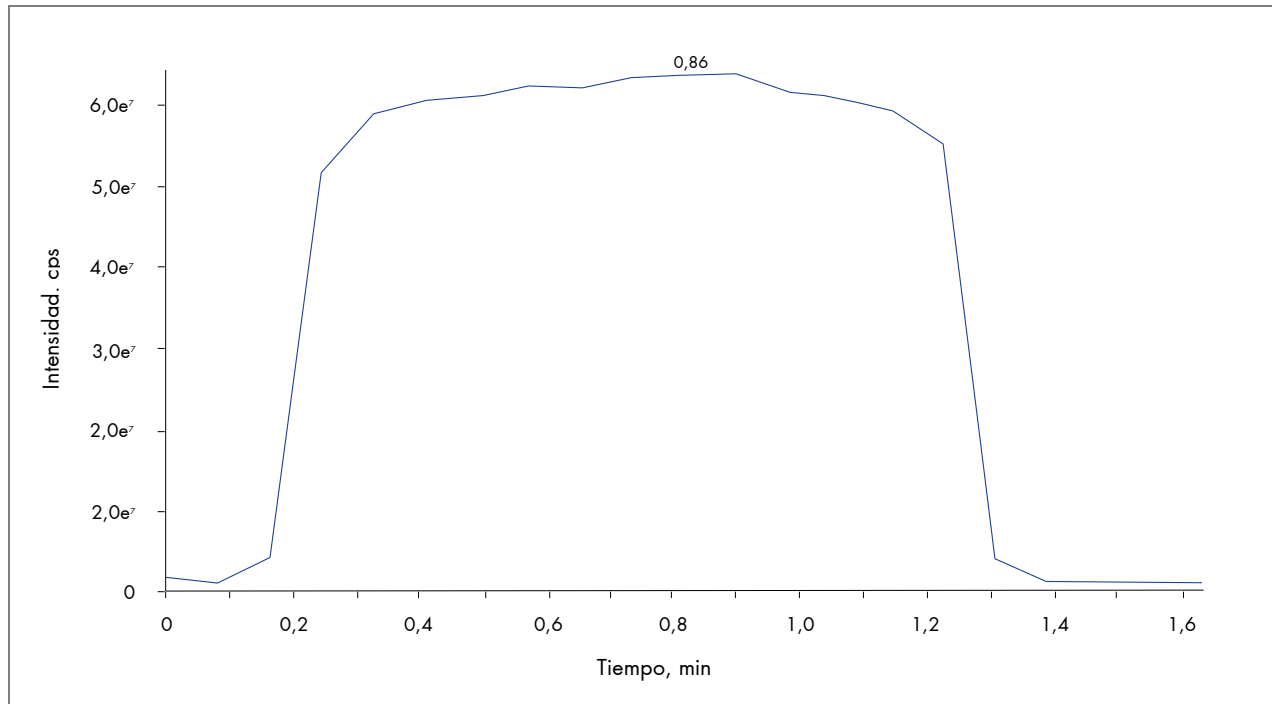


Imagen 1: Cromatograma de gradientes de flujo optimizado

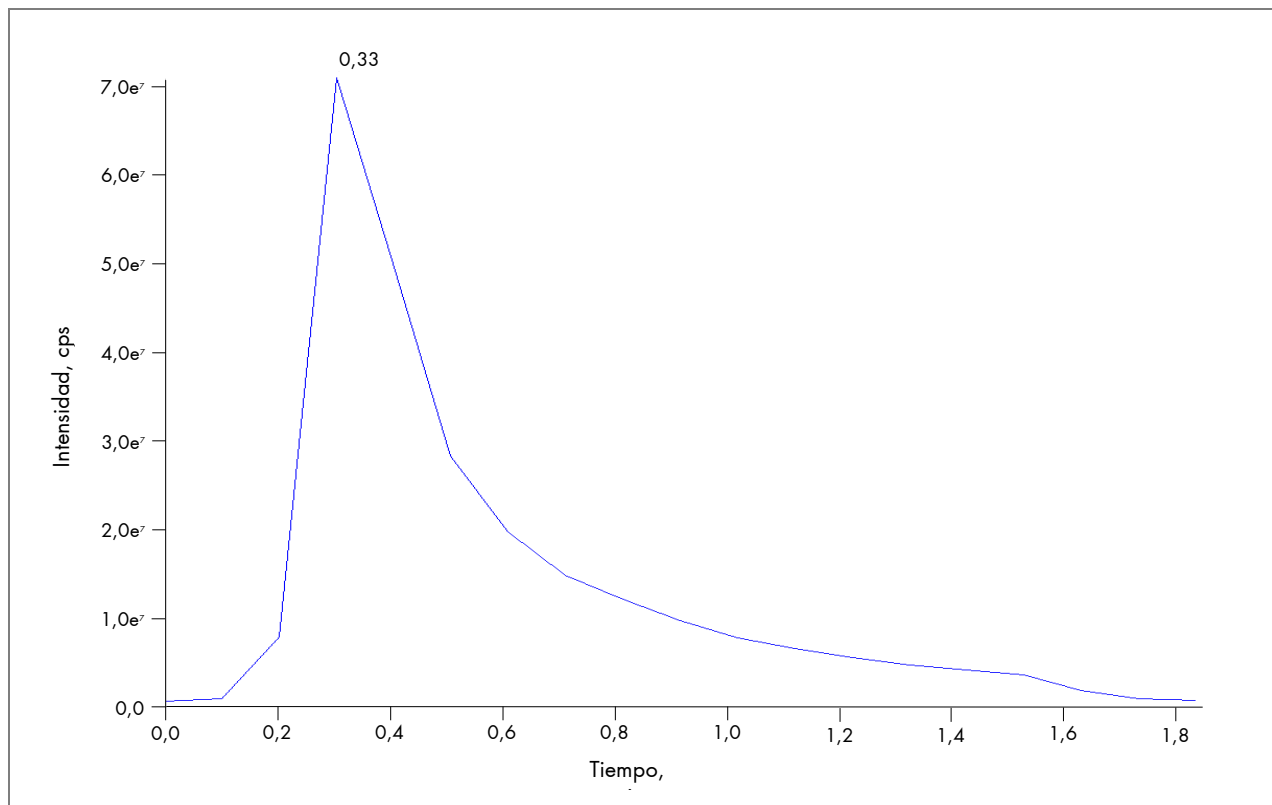


Imagen 2: Cromatograma de gradientes de flujo NO optimizado

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.

Tabla 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
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

Sustancia	Modo de medición	Transición
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 (n° 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
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

Sustancia	Modo de medición	Transición
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
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/FR) 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/FR) con 50 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 50 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 50 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 con placa filtrante de 96 pocillos sin succinilacetona

1. Punzonado de la muestra:

Posicionar una placa filtrante de 96 pocillos (96 Well Filter Plate, n° de pedido 57057) sobre una placa de 96 pocillos (96 Well Plate, n° de pedido 57010). Recortar el punto de sangre seca de la tarjeta, con un diámetro de 3,2 mm, sobre la placa filtrante de 96 pocillos.

2. Extracción:

Añadir 200 µL del estándar interno reconstituido (véase cap. 5.2) a cada muestra. Cubrir la placa filtrante de 96 pocillos con una lámina protectora (Protective Sheet, n° de pedido 55011) y agitar las placas superpuestas durante 20 min a +20 hasta +25 °C y 600 rpm.

3. Centrifugado:

Retirar la lámina de la placa filtrante.

Antes de la centrifugación, compruebe los niveles de líquido en los pocillos de la placa superior (96 Well Filter Plate, n° de pedido 57057) sin levantar la placa de la placa de recogida (96 Well Plate, n° de pedido 57010). Si los pocillos individuales contienen menos líquido o no contienen líquido, las muestras afectadas deben excluirse de esta medición y debe repetirse la preparación de la muestra para estas muestras.

Centrifugar durante 5 min a 3000 x g la fracción sobrenadante a la placa de 96 pocillos. Retirar la placa filtrante de 96 pocillos y sellar la placa de 96 pocillos 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 placa filtrante de 96 pocillos con succinilacetona

1. Punzonado de la muestra:

Colocar una placa filtrante de 96 pocillos (96 Well Filter Plate, n° de pedido 57057) sobre una placa de 96 pocillos (96 Well Plate, n° de pedido 57010). Recortar un punto de sangre seca de la tarjeta de un diámetro de 3,2 mm y colocarlo en la placa filtrante de 96 pocillos.

2. Extracción:

Añadir 200 µL del estándar interno reconstituido (véase cap. 5.2) a cada muestra. Cubrir la placa filtrante de 96 pocillos con una lámina protectora (Protective Sheet, n° de pedido 55011) y agitar las placas superpuestas durante 20 min a +20 hasta +25 °C y 600 rpm.

3. Centrifugado:

Retirar la lámina de la placa filtrante de 96 pocillos.

Antes de la centrifugación, compruebe los niveles de líquido en los pocillos de la placa superior (96 Well Filter Plate, n° de pedido 57057) sin levantar la placa de la placa de recogida (96 Well Plate, n° de pedido 57010). Si los pocillos individuales contienen menos líquido o no contienen líquido, las muestras afectadas deben excluirse de esta medición y debe repetirse la preparación de la muestra para estas muestras.

Centrifugar el sobrenadante en la placa de 96 pocillos durante 5 min a 3000 x g. Retirar la placa filtrante de 96 pocillos con los discos de sangre seca. Sellar la placa de recogida de 96 pocillos 57010 con una nueva hoja protectora (Protective Sheet, n° de pedido 55011).

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 cuidadosamente la placa filtrante de 96 pocillos con una lámina protectora (Protective Sheet, n° de pedido 55011) y agitar 30 min a una temperatura de 45 °C y 400 rpm.

5. Unión de los extractos/centrifugación:

Retirar las láminas protectoras de la placa filtrante de 96 pocillos y de la placa de 96 pocillos. Juntar el extracto del paso 4 con el del paso 3 centrifugando la placa filtrante de 96 pocillos (que contiene el extracto del paso 4) 2 min a 3000 x g en la placa de 96 pocillos (que contiene el extracto del paso 3). Cerrar la placa de 96 pocillos con una lámina (Pierceable Heat Seal, n° de pedido 57014).

6. Incubación:

Antes de la inyección, incubar la placa de 96 pocillos durante 45 min a +45 °C y 400 rpm.

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 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	14 días	protegidas de la luz, cerradas herméticamente
+2 hasta +8 °C	14 días	protegidas de la luz, cerradas herméticamente
a menos de -18 °C	14 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. Los periodos de almacenamiento indicados más abajo podrán emplearse, en dichos casos, como valores orientativos.

La estabilidad de las muestras de análisis preparadas según capítulo 5.5.1 selladas con Cross-cut Adhesive Seals (n° de pedido 57015) es la siguiente:

Tabla 8: Estabilidad de las muestras preparadas en una placa de 96 pocillos (96 Well Plate, n° de pedido 57010), sellada con Cross-cut Adhesive Seals (n° de pedido 57015)

Temperatura de almacenamiento	Estabilidad	Otras condiciones de almacenamiento
+10 hasta +20 °C	12 horas	sellada con Cross-cut Adhesive Seals (n° de pedido 57015)

Si se precisan periodos de almacenamiento prolongados, sellar las placas de pocillos con Pierceable Heat Seals (n° de pedido 57014) o verter los eluatos en botellas pequeñas y cerrarlas herméticamente.

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 9: 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	5 días	protegidas de la luz, cerradas herméticamente
+2 hasta +8 °C	7 días	protegidas de la luz, cerradas herméticamente
a menos de -18 °C	7 días	protegidas de la luz, cerradas herméticamente

Nota

Una vez se haya perforado la lámina protectora perforable para 96 pocillos (Pierceable Heat Seal for 96 Well Plates) 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 termostatizable 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 50 ml
- Centrifugadora para placas filtrantes de 96 pocillos (velocidad de centrifugado: al menos 2200 x g)
- 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 10: 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 11: 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 µmol/L	54,96 µmol/L	55,83 µmol/L
C2-Carnitina	71,17 µmol/L	73,40 µmol/L	71,08 µmol/L
C3-Carnitina	6,35 µmol/L	6,41 µmol/L	6,34 µmol/L
C4-Carnitina	1,07 µmol/L	1,18 µmol/L	1,07 µmol/L
C5-Carnitina	0,43 µmol/L	0,37 µmol/L	0,48 µmol/L
C5DC-Carnitina	0,56 µmol/L	0,58 µmol/L	0,56 µmol/L
C6-Carnitina	0,17 µmol/L	0,17 µmol/L	0,17 µmol/L
C8-Carnitina	0,24 µmol/L	0,24 µmol/L	0,24 µmol/L
C10-Carnitina	0,35 µmol/L	0,29 µmol/L	0,35 µmol/L
C12-Carnitina	0,35 µmol/L	0,31 µmol/L	0,35 µmol/L
C14-Carnitina	0,50 µmol/L	0,49 µmol/L	0,50 µmol/L
C16-Carnitina	9,90 µmol/L	10,03 µmol/L	9,89 µmol/L
C18-Carnitina	2,06 µmol/L	2,07 µmol/L	2,06 µmol/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 12: Valores de corte, aminoácidos, [b]

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

Tabla 13: 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 14: Factores de conversión, aminoácidos y metabolito de la tirosina (SUAC)

Sustancia	$\mu\text{mol/L}$ en mg/L	mg/L en $\mu\text{mol/L}$
Alanina	x 0,0891	x 11,223
Arginina	x 0,1742	x 5,7405
Ácido aspártico	x 0,1331	x 7,5126
Citrulina	x 0,1752	x 5,7081
Ácido 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
Succinilacetona	x 0,1581	x 6,3231
Tirosina	x 0,1812	x 5,5191
Valina	x 0,1172	x 8,5361

Tabla 15: 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 16: Condiciones de transporte del kit de reactivos:

Producto	Temperatura de transporte
Kit de reactivos (n° de pedido 57000/F)	+18 hasta +30 °C
Succinylacetone Upgrade Set (n° de pedido 57111/F)	+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 17: 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 Mix (n° de pedido 57004/FR)	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), del Internal Standard Mix reconstituido (n° de pedido 57004/FR, 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 fenilcetonuria, 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, carbamazol, cefalexina, cetirizina, clorprotixeno, clemastina (meclostina), clenbuterol, clomipramina, clonidina, clotrimazol, colchicina, ciclofosfamida, ciproterona, difenhidramina, domperidona, etambutol, etilefrina, ácido formiminoglutámico, fluticasona, fluvoxamina, fosfomicina, hidroxycloerquina, imipramina, irbesartán, isoniazida, lactulosa, maprotilina, melperona, mepivacaína, mercaptopurina, mesalazina, metronidazol, moxifloxacin, 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, carbamilglutamato, 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, norverapamil, omeprazol, oxazepam, oxicodona, 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, verapamil, 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, amobarbital, anfetamina, barbitol, BDB (1-(1,3-benzodioxol-5-il)-2-butilamina), benzoilecgonina, butalbital, butilona, catinona, cocaetilo, cocaína, 11-Nor-9-carboxi-THC, hexobarbital, hidrocodona, hidromorfona, LSD (dietilamida de ácido lisérgico), MBDB (2-metilamino-1-(3,4-metilendioxi-fenil)butano), MDA (3,4-metilendioxi-anfetamina), MDEA (3,4-metilendioxi-n-etilanfetamina), MDMA (3,4-metilendioxi-n-etilanfetamina), MDPV (metilendioxi-pi-rovalerona), meconina, mefedrona, mescalina, metanfetamina, metacualona, metilona, norcocaína, norcodeína, oximorfona, papaverina, PCP (fenilciclohexilpiperidina), pentobarbital, PMA (4-metoxianfetamina), secbutabarbitol, secobarbital, 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 18: 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	Limpiar el espectrómetro
	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 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 19: 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 Mix (n° de pedido 57004/FR) 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/FR 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 = 200 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 $\mu\text{mol/L}$:

$$0,141 \mu\text{mol/L} \times \frac{75 \mu\text{L}}{200 \mu\text{L}} = 0,053 \mu\text{mol/L}$$

Apéndice III: Datos de validación

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

- Espectrómetro de masas Waters® Xevo™ TQD
- Espectrómetro de masas SCIEX 4500MD™
- Espectrómetro de masas Shimadzu LCMS-8050-Triple Quadrupole
- Espectrómetro de masas SCIEX API 4000™
- Espectrómetro de masas Waters® ACQUITY™ TQD

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

IIIa: Preparación sin succinilacetona

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 20: Tasas de recuperación, análisis con espectrómetro de masas Waters® Xevo™ TQD, aminoácidos

Sustancia	Tasa de recuperación en sangre seca (concentración añadida)		
Alanina	91 % (736 µmol/L)	94 % (1472 µmol/L)	100 % (2208 µmol/L)
Arginina	101 % (55,0 µmol/L)	100 % (110 µmol/L)	104 % (165 µmol/L)
Ácido aspártico	99 % (420 µmol/L)	95 % (840 µmol/L)	103 % (1260 µmol/L)
Citrulina	99 % (50,0 µmol/L)	97 % (100 µmol/L)	103 % (150 µmol/L)
Ácido glutámico	98 % (1073 µmol/L)	96 % (2146 µmol/L)	101 % (3219 µmol/L)
Glicina	95 % (1001 µmol/L)	94 % (2002 µmol/L)	100 % (3003 µmol/L)
Leucina	94 % (276 µmol/L)	95 % (552 µmol/L)	100 % (828 µmol/L)
Metionina	93 % (37,0 µmol/L)	95 % (74,0 µmol/L)	101 % (111 µmol/L)
Ornitina	97 % (453 µmol/L)	97 % (906 µmol/L)	101 % (1359 µmol/L)
Fenilalanina	94 % (141 µmol/L)	95 % (282 µmol/L)	101 % (423 µmol/L)
Prolina	94 % (441 µmol/L)	95 % (882 µmol/L)	100 % (1323 µmol/L)
Tirosina	96 % (248 µmol/L)	95 % (496 µmol/L)	101 % (744 µmol/L)
Valina	93 % (212 µmol/L)	94 % (424 µmol/L)	100 % (636 µmol/L)

Tabla 21: Tasas de recuperación, análisis con espectrómetro de masas Waters® Xevo™ TQD, acilcarnitinas y carnitina libre

Sustancia	Tasa de recuperación en sangre seca (concentración añadida)		
C0-Carnitina	94 % (55,8 µmol/L)	96 % (112 µmol/L)	101 % (167 µmol/L)
C2-Carnitina	95 % (71,1 µmol/L)	93 % (142 µmol/L)	100 % (213 µmol/L)
C3-Carnitina	95 % (6,34 µmol/L)	94 % (12,7 µmol/L)	100 % (19,0 µmol/L)
C4-Carnitina	96 % (1,07 µmol/L)	94 % (2,14 µmol/L)	99 % (3,21 µmol/L)
C5-Carnitina	93 % (0,480 µmol/L)	94 % (0,960 µmol/L)	100 % (1,44 µmol/L)
C5DC-Carnitina	100 % (0,560 µmol/L)	92 % (1,12 µmol/L)	101 % (1,68 µmol/L)
C6-Carnitina	95 % (0,170 µmol/L)	94 % (0,340 µmol/L)	100 % (0,510 µmol/L)
C8-Carnitina	96 % (0,240 µmol/L)	94 % (0,480 µmol/L)	99 % (0,720 µmol/L)
C10-Carnitina	95 % (0,350 µmol/L)	94 % (0,700 µmol/L)	98 % (1,05 µmol/L)
C12-Carnitina	96 % (0,350 µmol/L)	94 % (0,700 µmol/L)	99 % (1,05 µmol/L)
C14-Carnitina	96 % (0,500 µmol/L)	94 % (1,00 µmol/L)	98 % (1,50 µmol/L)
C16-Carnitina	95 % (9,89 µmol/L)	93 % (19,8 µmol/L)	99 % (29,7 µmol/L)
C18-Carnitina	95 % (2,06 µmol/L)	96 % (4,12 µmol/L)	102 % (6,18 µmol/L)

Tabla 22: Tasas de recuperación, análisis con espectrómetro de masas SCIEX 4500MD™, aminoácidos

Sustancia	Tasa de recuperación en sangre seca (concentración añadida)		
Alanina	99 % (736 µmol/L)	94 % (1472 µmol/L)	96 % (2208 µmol/L)
Arginina	103 % (55,0 µmol/L)	100 % (110 µmol/L)	102 % (165 µmol/L)
Ácido aspártico	101 % (420 µmol/L)	97 % (840 µmol/L)	100 % (1260 µmol/L)
Citrulina	100 % (50,0 µmol/L)	96 % (100 µmol/L)	98 % (150 µmol/L)
Ácido glutámico	102 % (1073 µmol/L)	97 % (2146 µmol/L)	99 % (3219 µmol/L)
Glicina	101 % (1001 µmol/L)	95 % (2002 µmol/L)	96 % (3003 µmol/L)
Leucina	100 % (276 µmol/L)	96 % (552 µmol/L)	97 % (828 µmol/L)
Metionina	100 % (37,0 µmol/L)	91 % (74,0 µmol/L)	97 % (111 µmol/L)
Ornitina	100 % (453 µmol/L)	97 % (906 µmol/L)	99 % (1359 µmol/L)
Fenilalanina	101 % (141 µmol/L)	95 % (282 µmol/L)	97 % (423 µmol/L)
Prolina	99 % (441 µmol/L)	95 % (882 µmol/L)	97 % (1323 µmol/L)
Tirosina	100 % (248 µmol/L)	96 % (496 µmol/L)	99 % (744 µmol/L)
Valina	101 % (212 µmol/L)	96 % (424 µmol/L)	97 % (636 µmol/L)

Tabla 23: Tasas de recuperación, análisis con espectrómetro de masas SCIEX 4500MD™, acilcarnitinas y carnitina libre

Sustancia	Tasa de recuperación en sangre seca (concentración añadida)		
C0-Carnitina	99 % (55,8 µmol/L)	95 % (112 µmol/L)	95 % (167 µmol/L)
C2-Carnitina	99 % (71,1 µmol/L)	94 % (142 µmol/L)	98 % (213 µmol/L)
C3-Carnitina	99 % (6,34 µmol/L)	94 % (12,7 µmol/L)	97 % (19,0 µmol/L)
C4-Carnitina	98 % (1,07 µmol/L)	94 % (2,14 µmol/L)	99 % (3,21 µmol/L)

Sustancia	Tasa de recuperación en sangre seca (concentración añadida)		
C5-Carnitina	100 % (0,480 µmol/L)	94 % (0,960 µmol/L)	98 % (1,44 µmol/L)
C5DC-Carnitina	98 % (0,560 µmol/L)	95 % (1,12 µmol/L)	99 % (1,68 µmol/L)
C6-Carnitina	97 % (0,170 µmol/L)	94 % (0,340 µmol/L)	99 % (0,510 µmol/L)
C8-Carnitina	98 % (0,240 µmol/L)	95 % (0,480 µmol/L)	98 % (0,720 µmol/L)
C10-Carnitina	100 % (0,350 µmol/L)	93 % (0,700 µmol/L)	98 % (1,05 µmol/L)
C12-Carnitina	98 % (0,350 µmol/L)	93 % (0,700 µmol/L)	98 % (1,05 µmol/L)
C14-Carnitina	100 % (0,500 µmol/L)	94 % (1,00 µmol/L)	98 % (1,50 µmol/L)
C16-Carnitina	100 % (9,89 µmol/L)	95 % (19,8 µmol/L)	98 % (29,7 µmol/L)
C18-Carnitina	100 % (2,06 µmol/L)	95 % (4,12 µmol/L)	99 % (6,18 µmol/L)

Tabla 24: Tasas de recuperación, análisis con espectrómetro de masas Shimadzu LCMS-8050, aminoácidos

Sustancia	Tasa de recuperación en sangre seca (concentración añadida)		
Alanina	100 % (736 µmol/L)	94 % (1472 µmol/L)	97 % (2208 µmol/L)
Arginina	103 % (55,0 µmol/L)	98 % (110 µmol/L)	102 % (165 µmol/L)
Ácido aspártico	108 % (420 µmol/L)	101 % (840 µmol/L)	108 % (1260 µmol/L)
Citrulina	104 % (50,0 µmol/L)	96 % (100 µmol/L)	98 % (150 µmol/L)
Ácido glutámico	102 % (1073 µmol/L)	95 % (2146 µmol/L)	100 % (3219 µmol/L)
Glicina	99 % (1001 µmol/L)	95 % (2002 µmol/L)	98 % (3003 µmol/L)
Leucina	101 % (276 µmol/L)	96 % (552 µmol/L)	97 % (828 µmol/L)
Metionina	100 % (37,0 µmol/L)	94 % (74,0 µmol/L)	99 % (111 µmol/L)
Ornitina	92 % (453 µmol/L)	94 % (906 µmol/L)	94 % (1359 µmol/L)
Fenilalanina	100 % (141 µmol/L)	95 % (282 µmol/L)	97 % (423 µmol/L)
Prolina	100 % (441 µmol/L)	95 % (882 µmol/L)	98 % (1323 µmol/L)
Tirosina	99 % (248 µmol/L)	95 % (496 µmol/L)	98 % (744 µmol/L)
Valina	101 % (212 µmol/L)	96 % (424 µmol/L)	97 % (636 µmol/L)

Tabla 25: Tasas de recuperación, análisis con espectrómetro de masas Shimadzu LCMS-8050, acilcarnitinas y carnitina libre

Sustancia	Tasa de recuperación en sangre seca (concentración añadida)		
C0-Carnitina	101 % (55,8 µmol/L)	94 % (112 µmol/L)	97 % (167 µmol/L)
C2-Carnitina	99 % (71,1 µmol/L)	93 % (142 µmol/L)	98 % (213 µmol/L)
C3-Carnitina	98 % (6,34 µmol/L)	94 % (12,7 µmol/L)	98 % (19,0 µmol/L)
C4-Carnitina	98 % (1,07 µmol/L)	95 % (2,14 µmol/L)	98 % (3,21 µmol/L)
C5-Carnitina	100 % (0,480 µmol/L)	98 % (0,960 µmol/L)	98 % (1,44 µmol/L)
C5DC-Carnitina	95 % (0,560 µmol/L)	96 % (1,12 µmol/L)	98 % (1,68 µmol/L)
C6-Carnitina	99 % (0,170 µmol/L)	94 % (0,340 µmol/L)	98 % (0,510 µmol/L)
C8-Carnitina	99 % (0,240 µmol/L)	93 % (0,480 µmol/L)	96 % (0,720 µmol/L)
C10-Carnitina	99 % (0,350 µmol/L)	94 % (0,700 µmol/L)	97 % (1,05 µmol/L)
C12-Carnitina	99 % (0,350 µmol/L)	93 % (0,700 µmol/L)	97 % (1,05 µmol/L)

Sustancia	Tasa de recuperación en sangre seca (concentración añadida)		
C14-Carnitina	99 % (0,500 µmol/L)	94 % (1,00 µmol/L)	98 % (1,50 µmol/L)
C16-Carnitina	100 % (9,89 µmol/L)	93 % (19,8 µmol/L)	97 % (29,7 µmol/L)
C18-Carnitina	100 % (2,06 µmol/L)	95 % (4,12 µmol/L)	99 % (6,18 µmol/L)

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

La linealidad y el límite superior de cuantificación se determinaron añadiendo cantidades definidas de sustancias estándar a muestras de sangre total y analizando a continuación los puntos de sangre seca obtenidos con ellas. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) se calculó mediante diluciones definidas de una muestra a la que se añadió una matriz pobre en analitos y analizando a continuación los puntos de sangre seca obtenidos con ella.

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

Tabla 26: Linealidad y límite de cuantificación del análisis, análisis con espectrómetro de masas Waters® Xevo™ TQD, aminoácidos

Sustancia	Límite inferior de cuantificación (LLOQ)	Rango lineal hasta por lo menos
Alanina	15,3 µmol/L	5000 µmol/L
Arginina	6,56 µmol/L	2500 µmol/L
Ácido aspártico	26,9 µmol/L	2500 µmol/L
Citrulina	9,58 µmol/L	2500 µmol/L
Ácido glutámico	6,50 µmol/L	5000 µmol/L
Glicina	13,2 µmol/L	5000 µmol/L
Leucina	3,66 µmol/L	2500 µmol/L
Metionina	0,460 µmol/L	2500 µmol/L
Ornitina	3,27 µmol/L	2500 µmol/L
Fenilalanina	4,69 µmol/L	2500 µmol/L
Prolina	3,36 µmol/L	2500 µmol/L
Tirosina	2,73 µmol/L	2500 µmol/L
Valina	1,58 µmol/L	2500 µmol/L

Tabla 27: Linealidad y límite de cuantificación del análisis, análisis con espectrómetro de masas Waters® Xevo™ TQD, acilcarnitinas y carnitina libre

Sustancia	Límite inferior de cuantificación (LLOQ)	Rango lineal hasta por lo menos
C0-Carnitina	0,367 µmol/L	300 µmol/L
C2-Carnitina	0,166 µmol/L	400 µmol/L
C3-Carnitina	0,027 µmol/L	50,0 µmol/L
C4-Carnitina	0,024 µmol/L	50,0 µmol/L
C5-Carnitina	0,020 µmol/L	25,0 µmol/L
C5DC-Carnitina	0,044 µmol/L	25,0 µmol/L
C6-Carnitina	0,008 µmol/L	25,0 µmol/L

Sustancia	Límite inferior de cuantificación (LLOQ)	Rango lineal hasta por lo menos
C8-Carnitina	0,010 µmol/L	25,0 µmol/L
C10-Carnitina	0,030 µmol/L	22,5 µmol/L
C12-Carnitina	0,008 µmol/L	22,5 µmol/L
C14-Carnitina	0,007 µmol/L	22,5 µmol/L
C16-Carnitina	0,055 µmol/L	100 µmol/L
C18-Carnitina	0,029 µmol/L	50,0 µmol/L

Tabla 28: Linealidad y límite de cuantificación del análisis, análisis con espectrómetro de masas SCIEX 4500MD™, aminoácidos

Sustancia	Límite inferior de cuantificación (LLOQ)	Rango lineal hasta por lo menos
Alanina	6,29 µmol/L	5000 µmol/L
Arginina	8,33 µmol/L	2500 µmol/L
Ácido aspártico	27,7 µmol/L	2500 µmol/L
Citrulina	8,77 µmol/L	2500 µmol/L
Ácido glutámico	5,18 µmol/L	5000 µmol/L
Glicina	6,33 µmol/L	5000 µmol/L
Leucina	3,94 µmol/L	2500 µmol/L
Metionina	0,198 µmol/L	2500 µmol/L
Ornitina	3,14 µmol/L	2500 µmol/L
Fenilalanina	2,19 µmol/L	2500 µmol/L
Prolina	4,34 µmol/L	2500 µmol/L
Tirosina	1,53 µmol/L	2500 µmol/L
Valina	3,23 µmol/L	2500 µmol/L

Tabla 29: Linealidad y límite de cuantificación del análisis, análisis con espectrómetro de masas SCIEX 4500MD™, acilcarnitinas y carnitina libre

Sustancia	Límite inferior de cuantificación (LLOQ)	Rango lineal hasta por lo menos
C0-Carnitina	0,947 µmol/L	300 µmol/L
C2-Carnitina	0,399 µmol/L	400 µmol/L
C3-Carnitina	0,076 µmol/L	50,0 µmol/L
C4-Carnitina	0,022 µmol/L	35,0 µmol/L
C5-Carnitina	0,015 µmol/L	22,5 µmol/L
C5DC-Carnitina	0,038 µmol/L	20,0 µmol/L
C6-Carnitina	0,025 µmol/L	17,5 µmol/L
C8-Carnitina	0,017 µmol/L	17,5 µmol/L
C10-Carnitina	0,010 µmol/L	17,5 µmol/L
C12-Carnitina	0,010 µmol/L	17,5 µmol/L
C14-Carnitina	0,021 µmol/L	20,0 µmol/L
C16-Carnitina	0,028 µmol/L	100 µmol/L
C18-Carnitina	0,017 µmol/L	45,0 µmol/L

Tabla 30: Linealidad y límite de cuantificación del análisis, análisis con espectrómetro de masas Shimadzu LCMS-8050, aminoácidos

Sustancia	Límite inferior de cuantificación (LLOQ)	Rango lineal hasta por lo menos
Alanina	9,81 µmol/L	5000 µmol/L
Arginina	6,12 µmol/L	2500 µmol/L
Ácido aspártico	25,6 µmol/L	2500 µmol/L
Citrulina	9,73 µmol/L	2500 µmol/L
Ácido glutámico	14,4 µmol/L	5000 µmol/L
Glicina	9,45 µmol/L	5000 µmol/L
Leucina	3,82 µmol/L	2500 µmol/L
Metionina	1,99 µmol/L	2500 µmol/L
Ornitina	11,8 µmol/L	2500 µmol/L
Fenilalanina	1,93 µmol/L	2500 µmol/L
Prolina	4,14 µmol/L	2500 µmol/L
Tirosina	1,92 µmol/L	2500 µmol/L
Valina	3,32 µmol/L	2500 µmol/L

Tabla 31: Linealidad y límite de cuantificación del análisis, análisis con espectrómetro de masas Shimadzu LCMS-8050, acilcarnitinas y carnitina libre

Sustancia	Límite inferior de cuantificación (LLOQ)	Rango lineal hasta por lo menos
C0-Carnitina	0,346 µmol/L	300 µmol/L
C2-Carnitina	0,064 µmol/L	400 µmol/L
C3-Carnitina	0,033 µmol/L	50,0 µmol/L
C4-Carnitina	0,016 µmol/L	40,0 µmol/L
C5-Carnitina	0,015 µmol/L	17,5 µmol/L
C5DC-Carnitina	0,142 µmol/L	25,0 µmol/L
C6-Carnitina	0,020 µmol/L	17,5 µmol/L
C8-Carnitina	0,013 µmol/L	17,5 µmol/L
C10-Carnitina	0,011 µmol/L	17,5 µmol/L
C12-Carnitina	0,019 µmol/L	17,5 µmol/L
C14-Carnitina	0,013 µmol/L	17,5 µmol/L
C16-Carnitina	0,012 µmol/L	100 µmol/L
C18-Carnitina	0,016 µmol/L	45,0 µmol/L

Precisión (repeatability & within-laboratory precision)

Los datos de rendimiento se calcularon llevando a cabo un procesamiento doble de 3 concentraciones diferentes en 10 días distintos, realizando 2 procesos al día. El procedimiento cumple así con lo establecido en CLSI EPO5-A3 y corresponde a un diseño de pruebas 10x2x2.

Tabla 32: Precisión (repeatability & within-laboratory precision), análisis con espectrómetro de masas Waters® Xevo™ TQD, aminoácidos

Sustancia	Promedio	Repetitividad		Within-Laboratory Precision	
		SD	Coeficiente de variación (95 % de intervalo de confianza)	SD	Coeficiente de variación (95 % de intervalo de confianza)
Alanina	240 µmol/L	6,82 µmol/L	2,8 % (2,2-4,1 %)	7,91 µmol/L	3,3 % (2,7-4,3 %)
	466 µmol/L	12,2 µmol/L	2,6 % (2,0-3,8 %)	21,1 µmol/L	4,5 % (3,6-6,2 %)
	669 µmol/L	20,3 µmol/L	3,0 % (2,3-4,4 %)	29,4 µmol/L	4,4 % (3,4-6,2 %)
Arginina	38,7 µmol/L	1,01 µmol/L	2,6 % (2,0-3,8 %)	1,25 µmol/L	3,2 % (2,6-4,2 %)
	68,4 µmol/L	2,63 µmol/L	3,8 % (2,9-5,5 %)	3,53 µmol/L	5,2 % (4,1-6,8 %)
	97,9 µmol/L	3,36 µmol/L	3,4 % (2,6-5,0 %)	4,34 µmol/L	4,4 % (3,5-6,1 %)
Ácido aspártico	238 µmol/L	7,76 µmol/L	3,3 % (2,5-4,7 %)	19,3 µmol/L	8,1 % (6,2-11,7 %)
	441 µmol/L	16,7 µmol/L	3,8 % (2,9-5,5 %)	28,1 µmol/L	6,4 % (5,0-8,7 %)
	644 µmol/L	17,3 µmol/L	2,7 % (2,1-3,9 %)	35,3 µmol/L	5,5 % (4,1-8,2 %)
Citulina	21,3 µmol/L	1,19 µmol/L	5,6 % (4,3-8,1 %)	1,45 µmol/L	6,8 % (5,5-8,9 %)
	44,0 µmol/L	2,76 µmol/L	6,3 % (4,8-9,1 %)	2,91 µmol/L	6,6 % (5,4-8,6 %)
	65,3 µmol/L	3,20 µmol/L	4,9 % (3,7-7,1 %)	3,50 µmol/L	5,4 % (4,3-7,0 %)
Ácido glutámico	535 µmol/L	11,7 µmol/L	2,2 % (1,7-3,2 %)	16,9 µmol/L	3,2 % (2,5-4,4 %)
	1039 µmol/L	27,9 µmol/L	2,7 % (2,1-3,9 %)	41,7 µmol/L	4,0 % (3,2-5,4 %)
	1540 µmol/L	42,0 µmol/L	2,7 % (2,1-3,9 %)	59,7 µmol/L	3,9 % (3,0-5,5 %)
Glicina	341 µmol/L	11,5 µmol/L	3,4 % (2,6-4,9 %)	13,7 µmol/L	4,0 % (3,3-5,2 %)
	678 µmol/L	20,3 µmol/L	3,0 % (2,3-4,3 %)	29,5 µmol/L	4,3 % (3,5-5,8 %)
	990 µmol/L	34,5 µmol/L	3,5 % (2,7-5,0 %)	42,3 µmol/L	4,3 % (3,4-5,8 %)
Leucina	159 µmol/L	4,00 µmol/L	2,5 % (1,9-3,6 %)	5,71 µmol/L	3,6 % (2,8-4,9 %)
	278 µmol/L	7,68 µmol/L	2,8 % (2,1-4,0 %)	10,5 µmol/L	3,8 % (3,0-5,0 %)
	392 µmol/L	13,7 µmol/L	3,5 % (2,7-5,1 %)	17,9 µmol/L	4,6 % (3,6-6,3 %)
Metionina	16,7 µmol/L	0,566 µmol/L	3,4 % (2,6-4,9 %)	0,719 µmol/L	4,3 % (3,4-5,8 %)
	32,8 µmol/L	0,881 µmol/L	2,7 % (2,1-3,9 %)	1,08 µmol/L	3,3 % (2,7-4,3 %)
	46,4 µmol/L	1,57 µmol/L	3,4 % (2,6-4,9 %)	2,04 µmol/L	4,4 % (3,5-6,0 %)
Ornitina	275 µmol/L	7,45 µmol/L	2,7 % (2,1-3,9 %)	8,88 µmol/L	3,2 % (2,6-4,2 %)
	520 µmol/L	15,2 µmol/L	2,9 % (2,2-4,2 %)	19,8 µmol/L	3,8 % (3,1-5,0 %)
	738 µmol/L	18,4 µmol/L	2,5 % (1,9-3,6 %)	28,7 µmol/L	3,9 % (3,0-5,5 %)
Fenilalanina	68,1 µmol/L	1,83 µmol/L	2,7 % (2,1-3,9 %)	2,47 µmol/L	3,6 % (2,8-5,0 %)
	129 µmol/L	2,94 µmol/L	2,3 % (1,7-3,3 %)	4,25 µmol/L	3,3 % (2,6-4,4 %)
	184 µmol/L	5,55 µmol/L	3,0 % (2,3-4,3 %)	8,90 µmol/L	4,8 % (3,7-7,0 %)

Sustancia	Promedio	Repetitividad		Within-Laboratory Precision	
		SD	Coefficiente de variación (95 % de intervalo de confianza)	SD	Coefficiente de variación (95 % de intervalo de confianza)
Prolina	250 µmol/L	6,89 µmol/L	2,8 % (2,1–4,0 %)	18,2 µmol/L	7,3 % (5,2–12,2 %)
	469 µmol/L	12,0 µmol/L	2,6 % (2,0–3,7 %)	24,8 µmol/L	5,3 % (3,9–8,1 %)
	694 µmol/L	20,7 µmol/L	3,0 % (2,3–4,3 %)	53,2 µmol/L	7,7 % (5,5–12,7 %)
Tirosina	109 µmol/L	3,35 µmol/L	3,1 % (2,3–4,4 %)	4,18 µmol/L	3,8 % (3,1–5,1 %)
	214 µmol/L	5,85 µmol/L	2,7 % (2,1–3,9 %)	10,0 µmol/L	4,7 % (3,7–6,5 %)
	319 µmol/L	13,1 µmol/L	4,1 % (3,1–5,9 %)	16,8 µmol/L	5,3 % (4,1–7,3 %)
Valina	116 µmol/L	3,30 µmol/L	2,9 % (2,2–4,1 %)	7,08 µmol/L	6,1 % (4,4–10,0 %)
	187 µmol/L	5,31 µmol/L	2,8 % (2,2–4,1 %)	9,62 µmol/L	5,1 % (4,0–7,4 %)
	269 µmol/L	8,80 µmol/L	3,3 % (2,5–4,7 %)	19,3 µmol/L	7,2 % (5,2–11,5 %)

Tabla 33: Precisión (repeatability & within-laboratory precision), análisis con espectrómetro de masas Waters® Xevo™ TQD, acilcarnitinas y carnitina libre

Sustancia	Promedio	Repetitividad		Within-Laboratory Precision	
		SD	Coefficiente de variación (95 % de intervalo de confianza)	SD	Coefficiente de variación (95 % de intervalo de confianza)
C0-Carnitina	32,0 µmol/L	1,34 µmol/L	4,2 % (3,2–6,1 %)	1,68 µmol/L	5,2 % (4,1–7,2 %)
	60,4 µmol/L	1,99 µmol/L	3,3 % (2,5–4,8 %)	2,48 µmol/L	4,1 % (3,3–5,4 %)
	94,9 µmol/L	3,48 µmol/L	3,7 % (2,8–5,3 %)	4,72 µmol/L	5,0 % (4,0–6,7 %)
C2-Carnitina	28,2 µmol/L	0,929 µmol/L	3,3 % (2,5–4,8 %)	1,10 µmol/L	3,9 % (3,1–5,2 %)
	59,2 µmol/L	1,88 µmol/L	3,2 % (2,4–4,6 %)	2,58 µmol/L	4,4 % (3,5–5,8 %)
	89,2 µmol/L	2,51 µmol/L	2,8 % (2,2–4,1 %)	4,25 µmol/L	4,8 % (3,6–6,9 %)
C3-Carnitina	2,69 µmol/L	0,068 µmol/L	2,5 % (1,9–3,6 %)	0,091 µmol/L	3,4 % (2,7–4,5 %)
	4,77 µmol/L	0,167 µmol/L	3,5 % (2,7–5,1 %)	0,191 µmol/L	4,0 % (3,3–5,2 %)
	6,86 µmol/L	0,256 µmol/L	3,7 % (2,9–5,4 %)	0,334 µmol/L	4,9 % (3,8–6,7 %)
C4-Carnitina	0,441 µmol/L	0,014 µmol/L	3,2 % (2,5–4,6 %)	0,018 µmol/L	4,2 % (3,4–5,5 %)
	0,938 µmol/L	0,028 µmol/L	3,0 % (2,3–4,3 %)	0,038 µmol/L	4,0 % (3,2–5,4 %)
	1,35 µmol/L	0,061 µmol/L	4,5 % (3,4–6,5 %)	0,074 µmol/L	5,5 % (4,3–7,4 %)
C5-Carnitina	0,252 µmol/L	0,008 µmol/L	3,1 % (2,3–4,4 %)	0,011 µmol/L	4,4 % (3,4–6,2 %)
	0,443 µmol/L	0,012 µmol/L	2,8 % (2,1–4,0 %)	0,019 µmol/L	4,2 % (3,3–5,6 %)
	0,650 µmol/L	0,025 µmol/L	3,8 % (2,9–5,5 %)	0,035 µmol/L	5,4 % (4,2–7,5 %)
C5DC-Carnitina	0,318 µmol/L	0,017 µmol/L	5,3 % (4,0–7,6 %)	0,020 µmol/L	6,3 % (5,1–8,3 %)
	0,543 µmol/L	0,031 µmol/L	5,8 % (4,4–8,3 %)	0,042 µmol/L	7,8 % (6,2–10,3 %)
	0,770 µmol/L	0,041 µmol/L	5,3 % (4,1–7,6 %)	0,046 µmol/L	6,0 % (4,9–7,7 %)
C6-Carnitina	0,079 µmol/L	0,004 µmol/L	4,7 % (3,6–6,8 %)	0,005 µmol/L	5,9 % (4,8–7,8 %)
	0,168 µmol/L	0,007 µmol/L	3,9 % (3,0–5,7 %)	0,009 µmol/L	5,4 % (4,3–7,4 %)
	0,259 µmol/L	0,009 µmol/L	3,6 % (2,7–5,2 %)	0,013 µmol/L	5,1 % (3,9–7,4 %)

Sustancia	Promedio	Repetitividad		Within-Laboratory Precision	
		SD	Coeficiente de variación (95 % de intervalo de confianza)	SD	Coeficiente de variación (95 % de intervalo de confianza)
C8-Carnitina	0,097 µmol/L	0,006 µmol/L	6,7 % (5,1–9,7 %)	0,007 µmol/L	7,3 % (5,9–9,5 %)
	0,236 µmol/L	0,008 µmol/L	3,5 % (2,7–5,1 %)	0,010 µmol/L	4,4 % (3,5–5,7 %)
	0,301 µmol/L	0,014 µmol/L	4,6 % (3,5–6,6 %)	0,016 µmol/L	5,2 % (4,2–6,9 %)
C10-Carnitina	0,167 µmol/L	0,007 µmol/L	4,2 % (3,2–6,1 %)	0,009 µmol/L	5,5 % (4,4–7,2 %)
	0,291 µmol/L	0,009 µmol/L	3,0 % (2,3–4,3 %)	0,012 µmol/L	4,3 % (3,3–5,9 %)
	0,452 µmol/L	0,020 µmol/L	4,4 % (3,4–6,3 %)	0,022 µmol/L	5,0 % (4,0–6,4 %)
C12-Carnitina	0,179 µmol/L	0,007 µmol/L	4,0 % (3,0–5,7 %)	0,009 µmol/L	4,9 % (4,0–6,4 %)
	0,296 µmol/L	0,008 µmol/L	2,7 % (2,0–3,8 %)	0,013 µmol/L	4,4 % (3,5–6,1 %)
	0,449 µmol/L	0,018 µmol/L	4,1 % (3,2–5,9 %)	0,024 µmol/L	5,3 % (4,2–7,2 %)
C14-Carnitina	0,243 µmol/L	0,011 µmol/L	4,7 % (3,6–6,8 %)	0,013 µmol/L	5,2 % (4,2–6,8 %)
	0,457 µmol/L	0,012 µmol/L	2,7 % (2,1–3,9 %)	0,018 µmol/L	4,0 % (3,2–5,4 %)
	0,661 µmol/L	0,033 µmol/L	4,9 % (3,8–7,1 %)	0,040 µmol/L	6,0 % (4,8–8,2 %)
C16-Carnitina	4,05 µmol/L	0,125 µmol/L	3,1 % (2,4–4,5 %)	0,164 µmol/L	4,0 % (3,2–5,4 %)
	8,66 µmol/L	0,290 µmol/L	3,4 % (2,6–4,8 %)	0,406 µmol/L	4,7 % (3,8–6,2 %)
	13,3 µmol/L	0,521 µmol/L	3,9 % (3,0–5,7 %)	0,678 µmol/L	5,1 % (4,1–6,8 %)
C18-Carnitina	0,790 µmol/L	0,028 µmol/L	3,6 % (2,7–5,2 %)	0,036 µmol/L	4,5 % (3,6–6,0 %)
	1,79 µmol/L	0,059 µmol/L	3,3 % (2,5–4,8 %)	0,068 µmol/L	3,8 % (3,1–5,0 %)
	2,76 µmol/L	0,115 µmol/L	4,2 % (3,2–6,0 %)	0,144 µmol/L	5,2 % (4,2–7,0 %)

Tabla 34: Precisión (repeatability & within-laboratory precision), análisis con espectrómetro de masas SCIEX 4500MD™, aminoácidos

Sustancia	Promedio	Repetitividad		Within-Laboratory Precision	
		SD	Coeficiente de variación (95% de intervalo de confianza)	SD	Coeficiente de variación (95% de intervalo de confianza)
Alanina	248 µmol/L	7,50 µmol/L	3,0 % (2,3–4,4 %)	13,8 µmol/L	5,6 % (4,3–7,7 %)
	483 µmol/L	10,2 µmol/L	2,1 % (1,6–3,1 %)	20,9 µmol/L	4,3 % (3,2–6,6 %)
	697 µmol/L	15,6 µmol/L	2,2 % (1,7–3,2 %)	43,5 µmol/L	6,2 % (4,7–9,3 %)
Arginina	44,8 µmol/L	1,39 µmol/L	3,1 % (2,4–4,5 %)	2,14 µmol/L	4,8 % (3,8–6,4 %)
	75,5 µmol/L	1,95 µmol/L	2,6 % (2,0–3,7 %)	2,93 µmol/L	3,9 % (2,9–5,7 %)
	102 µmol/L	2,60 µmol/L	2,5 % (2,0–3,7 %)	5,16 µmol/L	5,1 % (4,0–7,0 %)
Ácido aspártico	234 µmol/L	8,17 µmol/L	3,5 % (2,7–5,0 %)	15,2 µmol/L	6,5 % (5,0–9,5 %)
	452 µmol/L	10,7 µmol/L	2,4 % (1,8–3,4 %)	19,9 µmol/L	4,4 % (3,3–6,6 %)
	657 µmol/L	14,2 µmol/L	2,2 % (1,7–3,1 %)	38,3 µmol/L	5,8 % (4,5–8,3 %)
Citulina	21,8 µmol/L	0,774 µmol/L	3,6 % (2,7–5,1 %)	1,14 µmol/L	5,2 % (4,2–7,0 %)
	44,4 µmol/L	1,24 µmol/L	2,8 % (2,1–4,0 %)	2,01 µmol/L	4,5 % (3,4–6,7 %)
	65,9 µmol/L	1,49 µmol/L	2,3 % (1,7–3,3 %)	4,18 µmol/L	6,4 % (4,8–9,6 %)

Sustancia	Promedio	Repetitividad		Within-Laboratory Precision	
		SD	Coeficiente de variación (95% de intervalo de confianza)	SD	Coeficiente de variación (95% de intervalo de confianza)
Ácido glutámico	564 µmol/L	16,0 µmol/L	2,8 % (2,2–4,1 %)	32,0 µmol/L	5,7 % (4,4–7,9 %)
	1120 µmol/L	26,2 µmol/L	2,3 % (1,8–3,4 %)	65,1 µmol/L	5,8 % (4,2–9,4 %)
	1649 µmol/L	32,7 µmol/L	2,0 % (1,5–2,9 %)	102 µmol/L	6,2 % (4,8–8,9 %)
Glicina	321 µmol/L	11,3 µmol/L	3,5 % (2,7–5,1 %)	17,5 µmol/L	5,5 % (4,3–7,4 %)
	645 µmol/L	16,9 µmol/L	2,6 % (2,0–3,8 %)	27,3 µmol/L	4,2 % (3,2–6,1 %)
	930 µmol/L	20,5 µmol/L	2,2 % (1,7–3,2 %)	56,1 µmol/L	6,0 % (4,6–8,8 %)
Leucina	164 µmol/L	4,34 µmol/L	2,6 % (2,0–3,8 %)	8,53 µmol/L	5,2 % (4,0–7,3 %)
	284 µmol/L	5,27 µmol/L	1,9 % (1,4–2,7 %)	15,3 µmol/L	5,4 % (3,9–8,8 %)
	394 µmol/L	8,59 µmol/L	2,2 % (1,7–3,1 %)	22,4 µmol/L	5,7 % (4,4–8,0 %)
Metionina	16,9 µmol/L	0,467 µmol/L	2,8 % (2,1–4,0 %)	1,00 µmol/L	5,9 % (4,6–8,5 %)
	33,2 µmol/L	0,617 µmol/L	1,9 % (1,4–2,7 %)	1,41 µmol/L	4,2 % (3,1–6,5 %)
	46,6 µmol/L	0,958 µmol/L	2,1 % (1,6–3,0 %)	2,73 µmol/L	5,9 % (4,5–8,5 %)
Ornitina	250 µmol/L	7,76 µmol/L	3,1 % (2,4–4,5 %)	12,9 µmol/L	5,1 % (4,1–7,1 %)
	471 µmol/L	18,6 µmol/L	3,9 % (3,0–5,7 %)	24,5 µmol/L	5,2 % (4,0–7,3 %)
	651 µmol/L	19,4 µmol/L	3,0 % (2,3–4,3 %)	41,9 µmol/L	6,4 % (5,0–9,0 %)
Fenilalanina	74,4 µmol/L	2,17 µmol/L	2,9 % (2,2–4,2 %)	3,95 µmol/L	5,3 % (4,2–7,4 %)
	144 µmol/L	3,31 µmol/L	2,3 % (1,8–3,3 %)	8,69 µmol/L	6,1 % (4,3–10,0 %)
	202 µmol/L	4,19 µmol/L	2,1 % (1,6–3,0 %)	12,4 µmol/L	6,1 % (4,7–8,8 %)
Prolina	236 µmol/L	7,11 µmol/L	3,0 % (2,3–4,3 %)	12,9 µmol/L	5,5 % (4,3–7,6 %)
	449 µmol/L	10,5 µmol/L	2,3 % (1,8–3,4 %)	20,9 µmol/L	4,7 % (3,5–7,1 %)
	659 µmol/L	16,0 µmol/L	2,4 % (1,9–3,5 %)	39,9 µmol/L	6,1 % (4,6–8,9 %)
Tirosina	122 µmol/L	3,82 µmol/L	3,1 % (2,4–4,5 %)	6,64 µmol/L	5,4 % (4,2–7,6 %)
	240 µmol/L	5,30 µmol/L	2,2 % (1,7–3,2 %)	14,7 µmol/L	6,1 % (4,4–10,3 %)
	350 µmol/L	6,37 µmol/L	1,8 % (1,4–2,6 %)	21,0 µmol/L	6,0 % (4,6–8,8 %)
Valina	126 µmol/L	3,45 µmol/L	2,7 % (2,1–4,0 %)	6,70 µmol/L	5,3 % (4,1–7,5 %)
	206 µmol/L	4,44 µmol/L	2,2 % (1,6–3,1 %)	12,4 µmol/L	6,0 % (4,3–10,0 %)
	295 µmol/L	6,74 µmol/L	2,3 % (1,8–3,3 %)	18,6 µmol/L	6,3 % (4,9–9,0 %)

Tabla 35: Precisión (repeatability & within-laboratory precision), análisis con espectrómetro de masas SCIEX 4500MD™, acilcarnitinas y carnitina libre

Sustancia	Promedio	Repetitividad		Within-Laboratory Precision	
		SD	Coeficiente de variación (95 % de intervalo de confianza)	SD	Coeficiente de variación (95% de intervalo de confianza)
CO-Carnitina	31,0 µmol/L	1,02 µmol/L	3,3 % (2,5–4,7 %)	1,73 µmol/L	5,6 % (4,4–7,7 %)
	59,3 µmol/L	1,46 µmol/L	2,5 % (1,9–3,6 %)	2,71 µmol/L	4,6 % (3,4–6,9 %)
	92,8 µmol/L	2,36 µmol/L	2,5 % (1,9–3,7 %)	5,04 µmol/L	5,4 % (4,2–7,7 %)

Sustancia	Promedio	Repetitividad		Within-Laboratory Precision	
		SD	Coeficiente de variación (95 % de intervalo de confianza)	SD	Coeficiente de variación (95% de intervalo de confianza)
C2-Carnitina	28,6 µmol/L	0,956 µmol/L	3,3 % (2,6-4,8 %)	1,53 µmol/L	5,3 % (4,2-7,2 %)
	60,8 µmol/L	1,31 µmol/L	2,1 % (1,6-3,1 %)	2,66 µmol/L	4,4 % (3,3-6,6 %)
	91,3 µmol/L	2,78 µmol/L	3,0 % (2,3-4,4 %)	5,75 µmol/L	6,3 % (4,9-8,9 %)
C3-Carnitina	2,85 µmol/L	0,093 µmol/L	3,3 % (2,5-4,7 %)	0,144 µmol/L	5,0 % (4,0-6,8 %)
	5,10 µmol/L	0,114 µmol/L	2,2 % (1,7-3,2 %)	0,228 µmol/L	4,5 % (3,3-6,7 %)
	7,22 µmol/L	0,205 µmol/L	2,8 % (2,2-4,1 %)	0,478 µmol/L	6,6 % (5,1-9,6 %)
C4-Carnitina	0,455 µmol/L	0,019 µmol/L	4,2 % (3,2-6,1 %)	0,024 µmol/L	5,3 % (4,3-6,9 %)
	0,966 µmol/L	0,025 µmol/L	2,6 % (2,0-3,8 %)	0,046 µmol/L	4,8 % (3,7-7,1 %)
	1,37 µmol/L	0,044 µmol/L	3,2 % (2,5-4,7 %)	0,081 µmol/L	5,9 % (4,7-8,1 %)
C5-Carnitina	0,241 µmol/L	0,009 µmol/L	3,9 % (3,0-5,6 %)	0,013 µmol/L	5,4 % (4,3-7,2 %)
	0,435 µmol/L	0,011 µmol/L	2,5 % (1,9-3,6 %)	0,021 µmol/L	4,7 % (3,5-7,3 %)
	0,627 µmol/L	0,018 µmol/L	2,8 % (2,2-4,1 %)	0,042 µmol/L	6,6 % (5,1-9,5 %)
C5DC-Carnitina	0,323 µmol/L	0,016 µmol/L	5,1 % (3,9-7,3 %)	0,041 µmol/L	12,6 % (9,5-18,6 %)
	0,547 µmol/L	0,021 µmol/L	3,9 % (3,0-5,7 %)	0,034 µmol/L	6,2 % (4,9-8,7 %)
	0,776 µmol/L	0,028 µmol/L	3,6 % (2,8-5,2 %)	0,049 µmol/L	6,3 % (4,9-8,6 %)
C6-Carnitina	0,115 µmol/L	0,008 µmol/L	6,6 % (5,0-9,5 %)	0,009 µmol/L	8,1 % (6,4-10,9 %)
	0,200 µmol/L	0,006 µmol/L	3,1 % (2,4-4,5 %)	0,010 µmol/L	4,9 % (3,8-6,9 %)
	0,289 µmol/L	0,010 µmol/L	3,6 % (2,7-5,1 %)	0,020 µmol/L	7,0 % (5,5-9,8 %)
C8-Carnitina	0,102 µmol/L	0,005 µmol/L	4,9 % (3,8-7,1 %)	0,008 µmol/L	7,9 % (6,3-10,6 %)
	0,246 µmol/L	0,009 µmol/L	3,9 % (3,0-5,6 %)	0,012 µmol/L	4,8 % (3,8-6,5 %)
	0,313 µmol/L	0,011 µmol/L	3,4 % (2,6-5,0 %)	0,023 µmol/L	7,4 % (5,7-10,4 %)
C10-Carnitina	0,154 µmol/L	0,006 µmol/L	4,1 % (3,2-6,0 %)	0,009 µmol/L	5,8 % (4,7-7,7 %)
	0,274 µmol/L	0,009 µmol/L	3,3 % (2,5-4,7 %)	0,013 µmol/L	4,9 % (3,9-6,8 %)
	0,417 µmol/L	0,014 µmol/L	3,4 % (2,6-4,8 %)	0,026 µmol/L	6,3 % (5,0-8,7 %)
C12-Carnitina	0,173 µmol/L	0,007 µmol/L	3,8 % (2,9-5,5 %)	0,010 µmol/L	5,7 % (4,5-7,7 %)
	0,288 µmol/L	0,012 µmol/L	4,1 % (3,1-5,9 %)	0,015 µmol/L	5,1 % (4,0-7,0 %)
	0,434 µmol/L	0,018 µmol/L	4,2 % (3,2-6,1 %)	0,029 µmol/L	6,7 % (5,3-9,0 %)
C14-Carnitina	0,233 µmol/L	0,009 µmol/L	3,9 % (3,0-5,7 %)	0,014 µmol/L	6,0 % (4,7-8,1 %)
	0,441 µmol/L	0,017 µmol/L	3,9 % (3,0-5,6 %)	0,022 µmol/L	4,9 % (3,9-6,8 %)
	0,632 µmol/L	0,029 µmol/L	4,6 % (3,6-6,7 %)	0,044 µmol/L	7,0 % (5,6-9,3 %)
C16-Carnitina	4,23 µmol/L	0,159 µmol/L	3,8 % (2,9-5,4 %)	0,241 µmol/L	5,7 % (4,5-7,7 %)
	8,97 µmol/L	0,331 µmol/L	3,7 % (2,8-5,3 %)	0,472 µmol/L	5,3 % (4,0-7,5 %)
	13,8 µmol/L	0,653 µmol/L	4,7 % (3,6-6,8 %)	1,04 µmol/L	7,6 % (6,0-10,3 %)
C18-Carnitina	0,869 µmol/L	0,030 µmol/L	3,5 % (2,6-5,0 %)	0,057 µmol/L	6,5 % (5,1-8,9 %)
	1,97 µmol/L	0,066 µmol/L	3,4 % (2,6-4,9 %)	0,089 µmol/L	4,5 % (3,5-6,4 %)
	2,99 µmol/L	0,102 µmol/L	3,4 % (2,6-4,9 %)	0,200 µmol/L	6,7 % (5,2-9,2 %)

Tabla 36: Precisión (repeatability & within-laboratory precision), análisis con espectrómetro de masas Shimadzu LCMS-8050, aminoácidos

Sustancia	Promedio	Repetitividad		Within-Laboratory Precision	
		SD	Coefficiente de variación (95% de intervalo de confianza)	SD	Coefficiente de variación (95% de intervalo de confianza)
Alanina	264 µmol/L	6,89 µmol/L	2,6 % (2,0–3,8 %)	14,5 µmol/L	5,5 % (4,3–7,6 %)
	514 µmol/L	11,1 µmol/L	2,2 % (1,6–3,1 %)	21,8 µmol/L	4,2 % (3,2–6,1 %)
	740 µmol/L	18,3 µmol/L	2,5 % (1,9–3,6 %)	43,6 µmol/L	5,9 % (4,4–8,7 %)
Arginina	44,8 µmol/L	1,51 µmol/L	3,4 % (2,6–4,9 %)	2,62 µmol/L	5,8 % (4,6–8,0 %)
	78,8 µmol/L	2,22 µmol/L	2,8 % (2,2–4,1 %)	3,96 µmol/L	5,0 % (3,9–7,0 %)
	111 µmol/L	4,55 µmol/L	4,1 % (3,1–5,9 %)	7,45 µmol/L	6,7 % (5,2–9,5 %)
Ácido aspártico	299 µmol/L	17,8 µmol/L	5,9 % (4,5–8,6 %)	22,2 µmol/L	7,4 % (5,9–9,9 %)
	568 µmol/L	25,9 µmol/L	4,6 % (3,5–6,6 %)	39,2 µmol/L	6,9 % (5,2–10,2 %)
	830 µmol/L	40,7 µmol/L	4,9 % (3,7–7,1 %)	60,4 µmol/L	7,3 % (5,8–9,8 %)
Citrulina	22,0 µmol/L	1,05 µmol/L	4,8 % (3,7–6,9 %)	1,43 µmol/L	6,5 % (5,2–8,6 %)
	44,8 µmol/L	1,66 µmol/L	3,7 % (2,8–5,4 %)	2,40 µmol/L	5,4 % (4,1–7,7 %)
	66,4 µmol/L	1,86 µmol/L	2,8 % (2,1–4,0 %)	4,07 µmol/L	6,1 % (4,8–8,6 %)
Ácido glutámico	578 µmol/L	27,1 µmol/L	4,7 % (3,6–6,8 %)	34,6 µmol/L	6,0 % (4,9–7,8 %)
	1138 µmol/L	31,6 µmol/L	2,8 % (2,1–4,0 %)	52,6 µmol/L	4,6 % (3,6–6,4 %)
	1686 µmol/L	44,6 µmol/L	2,6 % (2,0–3,8 %)	112 µmol/L	6,6 % (5,1–9,5 %)
Glicina	356 µmol/L	10,5 µmol/L	2,9 % (2,2–4,2 %)	17,4 µmol/L	4,9 % (3,9–6,7 %)
	701 µmol/L	15,7 µmol/L	2,2 % (1,7–3,2 %)	31,6 µmol/L	4,5 % (3,4–6,6 %)
	1017 µmol/L	25,3 µmol/L	2,5 % (1,9–3,6 %)	64,0 µmol/L	6,3 % (4,7–9,6 %)
Leucina	157 µmol/L	4,54 µmol/L	2,9 % (2,2–4,2 %)	7,89 µmol/L	5,0 % (3,9–7,0 %)
	275 µmol/L	5,50 µmol/L	2,0 % (1,5–2,9 %)	10,8 µmol/L	3,9 % (3,0–5,9 %)
	386 µmol/L	9,32 µmol/L	2,4 % (1,8–3,5 %)	22,9 µmol/L	5,9 % (4,6–8,5 %)
Metionina	17,8 µmol/L	0,599 µmol/L	3,4 % (2,6–4,9 %)	0,945 µmol/L	5,3 % (4,2–7,2 %)
	35,4 µmol/L	0,972 µmol/L	2,7 % (2,1–4,0 %)	1,79 µmol/L	5,1 % (3,8–7,7 %)
	49,7 µmol/L	1,65 µmol/L	3,3 % (2,5–4,8 %)	3,56 µmol/L	7,2 % (5,5–10,2 %)
Ornitina	286 µmol/L	17,2 µmol/L	6,0 % (4,6–8,7 %)	21,2 µmol/L	7,4 % (5,9–10,1 %)
	573 µmol/L	48,7 µmol/L	8,5 % (6,5–12,3 %)	53,6 µmol/L	9,4 % (7,6–12,3 %)
	796 µmol/L	43,1 µmol/L	5,4 % (4,1–7,8 %)	79,0 µmol/L	9,9 % (7,8–13,6 %)
Fenilalanina	68,8 µmol/L	1,96 µmol/L	2,8 % (2,2–4,1 %)	3,14 µmol/L	4,6 % (3,6–6,2 %)
	134 µmol/L	2,55 µmol/L	1,9 % (1,5–2,7 %)	5,82 µmol/L	4,3 % (3,2–6,9 %)
	190 µmol/L	4,45 µmol/L	2,3 % (1,8–3,4 %)	11,6 µmol/L	6,1 % (4,7–8,6 %)
Prolina	230 µmol/L	6,60 µmol/L	2,9 % (2,2–4,2 %)	17,8 µmol/L	7,7 % (5,9–11,4 %)
	431 µmol/L	9,20 µmol/L	2,1 % (1,6–3,1 %)	27,9 µmol/L	6,5 % (4,9–9,5 %)
	639 µmol/L	13,7 µmol/L	2,1 % (1,6–3,1 %)	39,5 µmol/L	6,2 % (4,8–8,8 %)
Tirosina	115 µmol/L	2,97 µmol/L	2,6 % (2,0–3,7 %)	5,66 µmol/L	4,9 % (3,8–6,9 %)
	226 µmol/L	4,78 µmol/L	2,1 % (1,6–3,1 %)	11,9 µmol/L	5,3 % (3,8–8,7 %)

Sustancia	Promedio	Repetitividad		Within-Laboratory Precision	
		SD	Coeficiente de variación (95% de intervalo de confianza)	SD	Coeficiente de variación (95% de intervalo de confianza)
Valina	330 µmol/L	6,49 µmol/L	2,0 % (1,5–2,8 %)	22,8 µmol/L	6,9 % (5,3–9,9 %)
	120 µmol/L	3,14 µmol/L	2,6 % (2,0–3,8 %)	5,84 µmol/L	4,9 % (3,8–6,7 %)
	195 µmol/L	3,92 µmol/L	2,0 % (1,5–2,9 %)	9,04 µmol/L	4,6 % (3,5–6,7 %)
	280 µmol/L	6,32 µmol/L	2,3 % (1,7–3,3 %)	16,7 µmol/L	6,0 % (4,6–8,5 %)

Tabla 37: Precisión (repeatability & within-laboratory precision), análisis con espectrómetro de masas Shimadzu LCMS-8050, acilcarnitinas y carnitina libre

Sustancia	Promedio	Repetitividad		Within-Laboratory Precision	
		SD	Coeficiente de variación (95% de intervalo de confianza)	SD	Coeficiente de variación (95% de intervalo de confianza)
C0-Carnitina	32,4 µmol/L	1,08 µmol/L	3,3 % (2,5–4,8 %)	2,11 µmol/L	6,5 % (5,1–9,1 %)
	61,1 µmol/L	1,53 µmol/L	2,5 % (1,9–3,6 %)	3,36 µmol/L	5,5 % (4,3–7,8 %)
	95,2 µmol/L	3,33 µmol/L	3,5 % (2,7–5,0 %)	5,61 µmol/L	5,9 % (4,6–8,1 %)
C2-Carnitina	27,3 µmol/L	0,738 µmol/L	2,7 % (2,1–3,9 %)	1,23 µmol/L	4,5 % (3,6–6,1 %)
	57,9 µmol/L	1,29 µmol/L	2,2 % (1,7–3,2 %)	2,27 µmol/L	3,9 % (3,0–5,6 %)
	87,7 µmol/L	2,40 µmol/L	2,7 % (2,1–4,0 %)	5,25 µmol/L	6,0 % (4,6–8,5 %)
C3-Carnitina	2,89 µmol/L	0,084 µmol/L	2,9 % (2,2–4,2 %)	0,150 µmol/L	5,2 % (4,1–7,1 %)
	5,16 µmol/L	0,126 µmol/L	2,4 % (1,9–3,5 %)	0,239 µmol/L	4,6 % (3,5–6,7 %)
	7,40 µmol/L	0,235 µmol/L	3,2 % (2,4–4,6 %)	0,438 µmol/L	5,9 % (4,6–8,1 %)
C4-Carnitina	0,450 µmol/L	0,014 µmol/L	3,1 % (2,3–4,4 %)	0,021 µmol/L	4,6 % (3,7–6,1 %)
	0,957 µmol/L	0,026 µmol/L	2,7 % (2,1–3,9 %)	0,045 µmol/L	4,7 % (3,6–6,9 %)
	1,35 µmol/L	0,043 µmol/L	3,2 % (2,4–4,6 %)	0,095 µmol/L	7,0 % (5,5–9,9 %)
C5-Carnitina	0,245 µmol/L	0,013 µmol/L	5,1 % (3,9–7,4 %)	0,020 µmol/L	8,1 % (6,4–11,2 %)
	0,441 µmol/L	0,011 µmol/L	2,6 % (2,0–3,7 %)	0,027 µmol/L	6,0 % (4,6–8,6 %)
	0,641 µmol/L	0,026 µmol/L	4,0 % (3,1–5,8 %)	0,046 µmol/L	7,2 % (5,7–10,0 %)
C5DC-Carnitina	0,320 µmol/L	0,020 µmol/L	6,1 % (4,7–8,8 %)	0,028 µmol/L	8,9 % (7,0–12,1 %)
	0,549 µmol/L	0,024 µmol/L	4,3 % (3,3–6,3 %)	0,047 µmol/L	8,6 % (6,4–12,9 %)
	0,780 µmol/L	0,031 µmol/L	4,0 % (3,1–5,8 %)	0,061 µmol/L	7,8 % (6,0–11,1 %)
C6-Carnitina	0,080 µmol/L	0,004 µmol/L	5,1 % (3,9–7,3 %)	0,006 µmol/L	7,6 % (6,0–10,4 %)
	0,170 µmol/L	0,006 µmol/L	3,4 % (2,6–4,9 %)	0,008 µmol/L	5,0 % (3,8–7,2 %)
	0,265 µmol/L	0,011 µmol/L	4,2 % (3,2–6,1 %)	0,017 µmol/L	6,4 % (5,1–8,5 %)
C8-Carnitina	0,093 µmol/L	0,004 µmol/L	4,7 % (3,6–6,8 %)	0,006 µmol/L	6,2 % (5,0–8,1 %)
	0,227 µmol/L	0,006 µmol/L	2,5 % (1,9–3,6 %)	0,010 µmol/L	4,4 % (3,3–6,5 %)
	0,291 µmol/L	0,011 µmol/L	3,8 % (2,9–5,4 %)	0,020 µmol/L	6,9 % (5,4–9,5 %)

Sustancia	Promedio	Repetitividad		Within-Laboratory Precision	
		SD	Coefficiente de variación (95% de intervalo de confianza)	SD	Coefficiente de variación (95% de intervalo de confianza)
C10-Carnitina	0,151 µmol/L	0,005 µmol/L	3,4 % (2,6–4,9 %)	0,008 µmol/L	5,3 % (4,2–7,2 %)
	0,268 µmol/L	0,006 µmol/L	2,3 % (1,8–3,4 %)	0,011 µmol/L	4,1 % (3,2–5,8 %)
	0,413 µmol/L	0,012 µmol/L	2,9 % (2,2–4,1 %)	0,030 µmol/L	7,2 % (5,5–10,2 %)
C12-Carnitina	0,181 µmol/L	0,007 µmol/L	3,6 % (2,8–5,3 %)	0,009 µmol/L	5,1 % (4,1–6,8 %)
	0,302 µmol/L	0,008 µmol/L	2,5 % (1,9–3,6 %)	0,012 µmol/L	4,1 % (3,1–6,0 %)
	0,454 µmol/L	0,014 µmol/L	3,2 % (2,4–4,6 %)	0,032 µmol/L	7,1 % (5,5–10,0 %)
C14-Carnitina	0,247 µmol/L	0,008 µmol/L	3,3 % (2,6–4,8 %)	0,016 µmol/L	6,3 % (4,9–8,9 %)
	0,464 µmol/L	0,010 µmol/L	2,2 % (1,7–3,2 %)	0,020 µmol/L	4,3 % (3,3–6,2 %)
	0,666 µmol/L	0,020 µmol/L	3,1 % (2,3–4,4 %)	0,040 µmol/L	6,0 % (4,7–8,2 %)
C16-Carnitina	3,84 µmol/L	0,101 µmol/L	2,6 % (2,0–3,8 %)	0,198 µmol/L	5,2 % (4,0–7,1 %)
	8,33 µmol/L	0,210 µmol/L	2,5 % (1,9–3,6 %)	0,346 µmol/L	4,2 % (3,1–6,2 %)
	12,9 µmol/L	0,346 µmol/L	2,7 % (2,1–3,9 %)	0,796 µmol/L	6,2 % (4,8–8,7 %)
C18-Carnitina	0,820 µmol/L	0,020 µmol/L	2,4 % (1,9–3,5 %)	0,041 µmol/L	5,0 % (3,9–7,0 %)
	1,86 µmol/L	0,054 µmol/L	2,9 % (2,2–4,2 %)	0,070 µmol/L	3,8 % (2,9–5,2 %)
	2,86 µmol/L	0,091 µmol/L	3,2 % (2,4–4,6 %)	0,201 µmol/L	7,0 % (5,4–10,1 %)

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.

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 38: Rangos de tolerancia - sistema HPLC

Sistema HPLC	Rango de tolerancia
Volumen de inyección	≤ 10 µL

Dependiendo del volumen de inyección, el gradiente de flujo debe optimizarse en consecuencia.

Tabla 39: Rangos de tolerancia - preparación de la muestra

Preparación de la muestra (capítulo 5.5.1, pasos 2 y 3)	Rango de tolerancia
Temperatura de extracción	20–30 °C
Duración de la incubación	18–30 min
Velocidad de agitado	500–700 rpm, en orbit de 2 mm
Velocidad de centrifugado	2200–3000 x g

IIIb: Preparación con succinilacetona

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 dos 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 40: Tasas de recuperación, análisis con espectrómetro de masas Waters® ACQUITY™ TQD, aminoácidos y succinilacetona

Sustancia	Tasa de recuperación en sangre seca (concentración añadida)	
Alanina	96 % (544 µmol/L)	92 % (1088 µmol/L)
Arginina	99 % (70,9 µmol/L)	96 % (142 µmol/L)
Ácido aspártico	87 % (420 µmol/L)	97 % (840 µmol/L)
Citrulina	102 % (93,9 µmol/L)	99 % (188 µmol/L)
Ácido glutámico	98 % (1073 µmol/L)	97 % (2146 µmol/L)
Glicina	103 % (742 µmol/L)	96 % (1484 µmol/L)
Leucina	100 % (349 µmol/L)	94 % (698 µmol/L)
Metionina	103 % (51,1 µmol/L)	97 % (102 µmol/L)
Ornitina	110 % (453 µmol/L)	98 % (906 µmol/L)
Fenilalanina	99 % (136 µmol/L)	96 % (272 µmol/L)
Prolina	100 % (441 µmol/L)	96 % (882 µmol/L)
Succinilacetona	98 % (1,23 µmol/L)	100 % (2,46 µmol/L)
Tirosina	102 % (335 µmol/L)	94 % (670 µmol/L)
Valina	101 % (276 µmol/L)	96 % (552 µmol/L)

Tabla 41: 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	105 % (55,4 µmol/L)	114 % (110,8 µmol/L)
C2-Carnitina	96 % (66,7 µmol/L)	103 % (133 µmol/L)
C3-Carnitina	96 % (7,19 µmol/L)	88 % (14,4 µmol/L)
C4-Carnitina	100 % (1,08 µmol/L)	90 % (2,16 µmol/L)
C5-Carnitina	97 % (0,58 µmol/L)	94 % (1,16 µmol/L)
C5DC-Carnitina	106 % (0,79 µmol/L)	96 % (1,58 µmol/L)
C6-Carnitina	98 % (0,24 µmol/L)	91 % (0,48 µmol/L)
C8-Carnitina	100 % (0,27 µmol/L)	92 % (0,54 µmol/L)
C10-Carnitina	101 % (0,35 µmol/L)	93 % (0,70 µmol/L)
C12-Carnitina	98 % (0,37 µmol/L)	91 % (0,74 µmol/L)
C14-Carnitina	97 % (0,56 µmol/L)	93 % (1,12 µmol/L)

Sustancia	Tasa de recuperación en sangre seca (concentración añadida)	
C16-Carnitina	99 % (7,66 µmol/L)	93 % (15,3 µmol/L)
C18-Carnitina	98 % (2,32 µmol/L)	92 % (4,64 µmol/L)

Tabla 42: Tasas de recuperación, análisis con espectrómetro de masas SCIEX API 4000™, aminoácidos y succinilacetona

Sustancia	Tasa de recuperación en sangre seca (concentración añadida)	
Alanina	103 % (544 µmol/L)	98 % (1088 µmol/L)
Arginina	98 % (70,9 µmol/L)	95 % (142 µmol/L)
Ácido aspártico	85 % (420 µmol/L)	95 % (840 µmol/L)
Citrulina	98 % (93,9 µmol/L)	95 % (188 µmol/L)
Ácido glutámico	97 % (1073 µmol/L)	95 % (2146 µmol/L)
Glicina	102 % (742 µmol/L)	96 % (1484 µmol/L)
Leucina	100 % (349 µmol/L)	97 % (698 µmol/L)
Metionina	98 % (51,1 µmol/L)	97 % (102 µmol/L)
Ornitina	99 % (453 µmol/L)	96 % (906 µmol/L)
Fenilalanina	100 % (136 µmol/L)	97 % (272 µmol/L)
Prolina	99 % (441 µmol/L)	96 % (882 µmol/L)
Succinilacetona	99 % (1,23 µmol/L)	92 % (2,46 µmol/L)
Tirosina	99 % (335 µmol/L)	96 % (670 µmol/L)
Valina	99 % (276 µmol/L)	96 % (552 µmol/L)

Tabla 43: Tasas de recuperación, análisis con espectrómetro de masas SCIEX API 4000™, acilcarnitinas y carnitina libre

Sustancia	Tasa de recuperación en sangre seca (concentración añadida)	
C0-Carnitina	104 % (55,4 µmol/L)	114 % (110,8 µmol/L)
C2-Carnitina	96 % (66,7 µmol/L)	104 % (133 µmol/L)
C3-Carnitina	97 % (7,19 µmol/L)	89 % (14,4 µmol/L)
C4-Carnitina	97 % (1,08 µmol/L)	90 % (2,16 µmol/L)
C5-Carnitina	98 % (0,58 µmol/L)	95 % (1,16 µmol/L)
C5DC-Carnitina	101 % (0,79 µmol/L)	98 % (1,58 µmol/L)
C6-Carnitina	98 % (0,24 µmol/L)	92 % (0,48 µmol/L)
C8-Carnitina	99 % (0,27 µmol/L)	93 % (0,54 µmol/L)
C10-Carnitina	99 % (0,35 µmol/L)	92 % (0,70 µmol/L)
C12-Carnitina	97 % (0,37 µmol/L)	92 % (0,74 µmol/L)
C14-Carnitina	99 % (0,56 µmol/L)	92 % (1,12 µmol/L)
C16-Carnitina	98 % (7,66 µmol/L)	93 % (15,3 µmol/L)
C18-Carnitina	97 % (2,32 µmol/L)	92 % (4,64 µmol/L)

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

La linealidad y el límite superior de cuantificación se determinaron añadiendo cantidades definidas de sustancias estándar a muestras de sangre total y analizando a continuación los puntos de sangre seca obtenidos con ellas. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) se calculó mediante diluciones definidas de una muestra a la que se añadió una matriz pobre en analitos y analizando a continuación los puntos de sangre seca obtenidos con ella.

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

Tabla 44: Linealidad y límite de cuantificación del análisis, análisis con espectrómetro de masas Waters® ACQUITY™ TQD, aminoácidos y succinilacetona

Sustancia	Límite inferior de cuantificación (LLOQ)	Rango lineal hasta por lo menos
Alanina	4,64 µmol/L	7000 µmol/L
Arginina	7,09 µmol/L	2500 µmol/L
Ácido aspártico	17,5 µmol/L	2500 µmol/L
Citrulina	10,5 µmol/L	2500 µmol/L
Ácido glutámico	22,5 µmol/L	7000 µmol/L
Glicina	13,5 µmol/L	7000 µmol/L
Leucina	3,70 µmol/L	2500 µmol/L
Metionina	6,58 µmol/L	2500 µmol/L
Ornitina	5,04 µmol/L	2500 µmol/L
Fenilalanina	4,63 µmol/L	2500 µmol/L
Prolina	6,75 µmol/L	2500 µmol/L
Succinilacetona	0,478 µmol/L	120 µmol/L
Tirosina	5,65 µmol/L	2500 µmol/L
Valina	2,91 µmol/L	2500 µmol/L

Tabla 45: 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	0,553 µmol/L	120 µmol/L
C2-Carnitina	0,057 µmol/L	400 µmol/L
C3-Carnitina	0,058 µmol/L	50 µmol/L
C4-Carnitina	0,044 µmol/L	50 µmol/L
C5-Carnitina	0,046 µmol/L	25 µmol/L
C5DC-Carnitina	0,098 µmol/L	13,5 µmol/L
C6-Carnitina	0,030 µmol/L	25 µmol/L
C8-Carnitina	0,032 µmol/L	25 µmol/L
C10-Carnitina	0,043 µmol/L	25 µmol/L
C12-Carnitina	0,031 µmol/L	20 µmol/L
C14-Carnitina	0,038 µmol/L	20 µmol/L
C16-Carnitina	0,140 µmol/L	80 µmol/L
C18-Carnitina	0,032 µmol/L	40 µmol/L

Tabla 46: Linealidad y límite de cuantificación del análisis, análisis con espectrómetro de masas SCIEX API 4000™, aminoácidos y succinilacetona

Sustancia	Límite inferior de cuantificación (LLOQ)	Rango lineal hasta por lo menos
Alanina	7,80 µmol/L	7000 µmol/L
Arginina	5,13 µmol/L	2500 µmol/L
Ácido aspártico	9,09 µmol/L	2500 µmol/L
Citrulina	5,19 µmol/L	2500 µmol/L
Ácido glutámico	10,0 µmol/L	7000 µmol/L
Glicina	12,8 µmol/L	7000 µmol/L
Leucina	2,24 µmol/L	2500 µmol/L
Metionina	7,20 µmol/L	2500 µmol/L
Ornitina	5,32 µmol/L	2500 µmol/L
Fenilalanina	2,35 µmol/L	2500 µmol/L
Prolina	4,53 µmol/L	2500 µmol/L
Succinilacetona	0,311 µmol/L	120 µmol/L
Tirosina	3,76 µmol/L	2500 µmol/L
Valina	2,64 µmol/L	2500 µmol/L

Tabla 47: Linealidad y límite de cuantificación del análisis, análisis con espectrómetro de masas SCIEX API 4000™, acilcarnitinas y carnitina libre

Sustancia	Límite inferior de cuantificación (LLOQ)	Rango lineal hasta por lo menos
C0-Carnitina	0,407 µmol/L	120 µmol/L
C2-Carnitina	0,475 µmol/L	400 µmol/L
C3-Carnitina	0,067 µmol/L	50 µmol/L
C4-Carnitina	0,044 µmol/L	50 µmol/L
C5-Carnitina	0,063 µmol/L	25 µmol/L
C5DC-Carnitina	0,079 µmol/L	15 µmol/L
C6-Carnitina	0,036 µmol/L	25 µmol/L
C8-Carnitina	0,018 µmol/L	25 µmol/L
C10-Carnitina	0,055 µmol/L	25 µmol/L
C12-Carnitina	0,029 µmol/L	20 µmol/L
C14-Carnitina	0,029 µmol/L	20 µmol/L
C16-Carnitina	0,044 µmol/L	80 µmol/L
C18-Carnitina	0,044 µmol/L	40 µmol/L

Precisión (repeatability & within-laboratory precision)

Los datos de rendimiento se calcularon llevando a cabo un procesamiento doble de 3 concentraciones diferentes en 20 días distintos, realizando 2 procesos al día. El procedimiento cumple así con lo establecido en CLSI EPO5-A3 y corresponde a un diseño de pruebas 20x2x2.

Tabla 48: Precisión (repeatability & within-laboratory precision), análisis con espectrómetro de masas Waters® ACQUITY™ TQD, aminoácidos y succinilacetona

Sustancia	Promedio	Repetitividad		Within-Laboratory Precision	
		SD	Coefficiente de variación (95 % de intervalo de confianza)	SD	Coefficiente de variación (95 % de intervalo de confianza)
Alanina	208 µmol/L	7,76 µmol/L	3,7 % (3,1–4,8 %)	13,3 µmol/L	6,4 % (5,2–8,3 %)
	330 µmol/L	11,2 µmol/L	3,4 % (2,8–4,3 %)	15,0 µmol/L	4,6 % (3,9–5,6 %)
	466 µmol/L	17,5 µmol/L	3,8 % (3,1–4,8 %)	27,5 µmol/L	5,9 % (4,9–7,3 %)
Arginina	49,5 µmol/L	2,19 µmol/L	4,4 % (3,6–5,7 %)	2,55 µmol/L	5,1 % (4,4–6,2 %)
	68,1 µmol/L	2,78 µmol/L	4,1 % (3,3–5,2 %)	3,12 µmol/L	4,6 % (4,0–5,4 %)
	94,9 µmol/L	2,70 µmol/L	2,8 % (2,3–3,6 %)	3,32 µmol/L	3,5 % (3,0–4,2 %)
Ácido aspártico	228 µmol/L	21,6 µmol/L	9,5 % (7,8–12,1 %)	22,4 µmol/L	9,8 % (8,5–11,6 %)
	468 µmol/L	37,2 µmol/L	8,0 % (6,5–10,2 %)	38,6 µmol/L	8,2 % (7,1–9,8 %)
	700 µmol/L	47,8 µmol/L	6,8 % (5,6–8,7 %)	55,9 µmol/L	8,0 % (6,8–9,6 %)
Citrulina	35,8 µmol/L	4,30 µmol/L	12,0 % (9,8–15,3 %)	4,68 µmol/L	13,1 % (11,3–15,5 %)
	73,2 µmol/L	7,21 µmol/L	9,8 % (8,1–12,6 %)	9,75 µmol/L	13,3 % (11,4–16,0 %)
	111 µmol/L	13,6 µmol/L	12,3 % (10,1–15,7 %)	13,6 µmol/L	12,3 % (10,6–14,6 %)
Ácido glutámico	509 µmol/L	30,1 µmol/L	5,9 % (4,9–7,6 %)	34,5 µmol/L	6,8 % (5,8–8,1 %)
	927 µmol/L	43,9 µmol/L	4,7 % (3,9–6,1 %)	47,3 µmol/L	5,1 % (4,4–6,1 %)
	1357 µmol/L	58,6 µmol/L	4,3 % (3,5–5,5 %)	75,3 µmol/L	5,6 % (4,7–6,7 %)
Glicina	218 µmol/L	12,7 µmol/L	5,8 % (4,8–7,5 %)	14,2 µmol/L	6,5 % (5,6–7,8 %)
	360 µmol/L	19,2 µmol/L	5,3 % (4,4–6,8 %)	20,7 µmol/L	5,7 % (4,9–6,8 %)
	512 µmol/L	27,9 µmol/L	5,4 % (4,5–7,0 %)	33,3 µmol/L	6,5 % (5,6–7,7 %)
Leucina	158 µmol/L	6,28 µmol/L	4,0 % (3,3–5,1 %)	7,34 µmol/L	4,6 % (4,0–5,6 %)
	278 µmol/L	9,19 µmol/L	3,3 % (2,7–4,2 %)	11,6 µmol/L	4,2 % (3,5–5,1 %)
	399 µmol/L	12,0 µmol/L	3,0 % (2,5–3,9 %)	15,5 µmol/L	3,9 % (3,3–4,7 %)
Metionina	26,1 µmol/L	2,23 µmol/L	8,5 % (7,0–10,9 %)	2,27 µmol/L	8,7 % (7,5–10,3 %)
	44,0 µmol/L	2,67 µmol/L	6,1 % (5,0–7,8 %)	3,03 µmol/L	6,9 % (5,9–8,2 %)
	63,0 µmol/L	3,22 µmol/L	5,1 % (4,2–6,5 %)	3,73 µmol/L	5,9 % (5,1–7,1 %)
Ornitina	248 µmol/L	9,82 µmol/L	4,0 % (3,3–5,1 %)	13,0 µmol/L	5,3 % (4,5–6,4 %)
	411 µmol/L	15,1 µmol/L	3,7 % (3,0–4,7 %)	19,0 µmol/L	4,6 % (3,9–5,6 %)
	580 µmol/L	20,8 µmol/L	3,6 % (2,9–4,6 %)	24,5 µmol/L	4,2 % (3,6–5,1 %)
Fenilalanina	68,7 µmol/L	3,20 µmol/L	4,6 % (3,8–5,9 %)	3,60 µmol/L	5,2 % (4,5–6,2 %)
	129 µmol/L	3,93 µmol/L	3,0 % (2,5–3,9 %)	5,46 µmol/L	4,2 % (3,5–5,3 %)
	191 µmol/L	5,42 µmol/L	2,8 % (2,3–3,6 %)	7,54 µmol/L	4,0 % (3,4–4,8 %)
Prolina	252 µmol/L	8,67 µmol/L	3,4 % (2,8–4,4 %)	14,8 µmol/L	5,8 % (4,8–7,4 %)

Sustancia	Promedio	Repetitividad		Within-Laboratory Precision	
		SD	Coeficiente de variación (95 % de intervalo de confianza)	SD	Coeficiente de variación (95 % de intervalo de confianza)
Succinilacetona	419 µmol/L	14,1 µmol/L	3,4 % (2,8–4,3 %)	21,1 µmol/L	5,0 % (4,2–6,4 %)
	587 µmol/L	15,8 µmol/L	2,7 % (2,2–3,5 %)	31,8 µmol/L	5,4 % (4,3–7,2 %)
	0,844 µmol/L	0,113 µmol/L	13,4 % (11,0–17,1 %)	0,124 µmol/L	14,7 % (12,7–17,6 %)
	1,66 µmol/L	0,213 µmol/L	12,9 % (10,6–16,4 %)	0,229 µmol/L	13,8 % (11,9–16,4 %)
	2,64 µmol/L	0,276 µmol/L	10,5 % (8,6–13,4 %)	0,276 µmol/L	10,5 % (9,0–12,4 %)
Tirosina	145 µmol/L	7,05 µmol/L	4,9 % (4,0–6,2 %)	8,40 µmol/L	5,8 % (4,9–7,0 %)
	277 µmol/L	12,1 µmol/L	4,3 % (3,6–5,6 %)	12,8 µmol/L	4,6 % (4,0–5,5 %)
	411 µmol/L	14,4 µmol/L	3,5 % (2,9–4,5 %)	19,6 µmol/L	4,8 % (4,1–5,8 %)
Valina	124 µmol/L	4,92 µmol/L	4,0 % (3,3–5,1 %)	6,53 µmol/L	5,3 % (4,5–6,4 %)
	201 µmol/L	6,99 µmol/L	3,5 % (2,9–4,5 %)	9,55 µmol/L	4,8 % (4,0–5,9 %)
	279 µmol/L	8,80 µmol/L	3,2 % (2,6–4,0 %)	12,6 µmol/L	4,5 % (3,8–5,5 %)

Tabla 49: Precisión (repeatability & within-laboratory precision), análisis con espectrómetro de masas Waters® ACQUITY™ TQD, acilcarnitinas y carnitina libre

Sustancia	Promedio	Repetitividad		Within-Laboratory Precision	
		SD	Coeficiente de variación (95 % de intervalo de confianza)	SD	Coeficiente de variación (95 % de intervalo de confianza)
C0-Carnitina	31,5 µmol/L	1,34 µmol/L	4,2 % (3,5–5,4 %)	1,58 µmol/L	5,0 % (4,3–6,0 %)
	52,9 µmol/L	2,28 µmol/L	4,3 % (3,5–5,5 %)	2,73 µmol/L	5,2 % (4,4–6,2 %)
	72,9 µmol/L	2,68 µmol/L	3,7 % (3,0–4,7 %)	3,65 µmol/L	5,0 % (4,3–6,0 %)
C2-Carnitina	23,2 µmol/L	1,10 µmol/L	4,8 % (3,9–6,1 %)	1,27 µmol/L	5,5 % (4,7–6,6 %)
	48,1 µmol/L	1,54 µmol/L	3,2 % (2,6–4,1 %)	1,83 µmol/L	3,8 % (3,3–4,6 %)
	70,8 µmol/L	2,35 µmol/L	3,3 % (2,7–4,2 %)	3,21 µmol/L	4,5 % (3,8–5,6 %)
C3-Carnitina	2,80 µmol/L	0,145 µmol/L	5,2 % (4,3–6,6 %)	0,156 µmol/L	5,6 % (4,8–6,6 %)
	5,54 µmol/L	0,234 µmol/L	4,2 % (3,5–5,4 %)	0,244 µmol/L	4,4 % (3,8–5,2 %)
	8,21 µmol/L	0,256 µmol/L	3,1 % (2,6–4,0 %)	0,371 µmol/L	4,5 % (3,8–5,6 %)
C4-Carnitina	0,377 µmol/L	0,035 µmol/L	9,3 % (7,6–11,9 %)	0,035 µmol/L	9,3 % (8,0–11,1 %)
	0,742 µmol/L	0,042 µmol/L	5,7 % (4,7–7,3 %)	0,051 µmol/L	6,9 % (5,8–8,4 %)
	1,18 µmol/L	0,063 µmol/L	5,3 % (4,4–6,8 %)	0,068 µmol/L	5,8 % (5,0–6,9 %)
C5-Carnitina	0,231 µmol/L	0,018 µmol/L	7,6 % (6,3–9,8 %)	0,019 µmol/L	8,3 % (7,1–9,9 %)
	0,448 µmol/L	0,026 µmol/L	5,8 % (4,7–7,4 %)	0,027 µmol/L	6,0 % (5,2–7,1 %)
	0,656 µmol/L	0,033 µmol/L	5,1 % (4,2–6,5 %)	0,033 µmol/L	5,1 % (4,4–6,0 %)
C5DC-Carnitina	0,436 µmol/L	0,047 µmol/L	10,8 % (8,8–13,8 %)	0,054 µmol/L	12,5 % (10,8–14,9 %)
	0,846 µmol/L	0,079 µmol/L	9,4 % (7,7–12,0 %)	0,088 µmol/L	10,3 % (8,9–12,3 %)
	1,34 µmol/L	0,116 µmol/L	8,7 % (7,1–11,1 %)	0,127 µmol/L	9,5 % (8,2–11,3 %)

Sustancia	Promedio	Repetitividad		Within-Laboratory Precision	
		SD	Coefficiente de variación (95 % de intervalo de confianza)	SD	Coefficiente de variación (95 % de intervalo de confianza)
C6-Carnitina	0,063 µmol/L	0,008 µmol/L	12,1 % (10,0–15,5 %)	0,008 µmol/L	12,6 % (10,9–15,0 %)
	0,183 µmol/L	0,014 µmol/L	7,8 % (6,4–9,9 %)	0,014 µmol/L	7,8 % (6,7–9,3 %)
	0,267 µmol/L	0,016 µmol/L	5,8 % (4,8–7,5 %)	0,018 µmol/L	6,9 % (5,9–8,3 %)
C8-Carnitina	0,116 µmol/L	0,012 µmol/L	10,4 % (8,5–13,3 %)	0,013 µmol/L	10,9 % (9,5–13,0 %)
	0,204 µmol/L	0,012 µmol/L	6,0 % (4,9–7,7 %)	0,014 µmol/L	6,7 % (5,7–7,9 %)
	0,312 µmol/L	0,015 µmol/L	4,7 % (3,9–6,0 %)	0,019 µmol/L	5,9 % (5,1–7,2 %)
C10-Carnitina	0,140 µmol/L	0,010 µmol/L	7,0 % (5,7–8,9 %)	0,011 µmol/L	8,2 % (7,1–9,8 %)
	0,256 µmol/L	0,012 µmol/L	4,9 % (4,0–6,2 %)	0,014 µmol/L	5,3 % (4,6–6,4 %)
	0,377 µmol/L	0,017 µmol/L	4,6 % (3,8–5,9 %)	0,021 µmol/L	5,5 % (4,7–6,6 %)
C12-Carnitina	0,141 µmol/L	0,012 µmol/L	8,3 % (6,8–10,6 %)	0,012 µmol/L	8,3 % (7,2–9,9 %)
	0,280 µmol/L	0,015 µmol/L	5,3 % (4,4–6,8 %)	0,018 µmol/L	6,4 % (5,5–7,8 %)
	0,409 µmol/L	0,016 µmol/L	3,9 % (3,2–5,0 %)	0,021 µmol/L	5,2 % (4,4–6,3 %)
C14-Carnitina	0,220 µmol/L	0,014 µmol/L	6,6 % (5,4–8,4 %)	0,016 µmol/L	7,3 % (6,3–8,6 %)
	0,418 µmol/L	0,022 µmol/L	5,3 % (4,3–6,8 %)	0,025 µmol/L	6,1 % (5,2–7,3 %)
	0,676 µmol/L	0,027 µmol/L	4,0 % (3,3–5,1 %)	0,035 µmol/L	5,2 % (4,4–6,2 %)
C16-Carnitina	2,90 µmol/L	0,139 µmol/L	4,8 % (3,9–6,1 %)	0,206 µmol/L	7,1 % (5,9–9,0 %)
	5,82 µmol/L	0,267 µmol/L	4,6 % (3,8–5,9 %)	0,372 µmol/L	6,4 % (5,3–8,1 %)
	8,41 µmol/L	0,320 µmol/L	3,8 % (3,1–4,9 %)	0,430 µmol/L	5,1 % (4,4–6,2 %)
C18-Carnitina	0,938 µmol/L	0,054 µmol/L	5,7 % (4,7–7,3 %)	0,103 µmol/L	11,0 % (8,8–14,5 %)
	1,86 µmol/L	0,092 µmol/L	4,9 % (4,0–6,3 %)	0,145 µmol/L	7,8 % (6,3–10,2 %)
	2,62 µmol/L	0,119 µmol/L	4,5 % (3,7–5,8 %)	0,169 µmol/L	6,4 % (5,4–7,9 %)

Tabla 50: Precisión (repeatability & within-laboratory precision), análisis con espectrómetro de masas SCIEX API 4000™, aminoácidos y succinilacetona

Sustancia	Promedio	Repetitividad		Within-Laboratory Precision	
		SD	Coefficiente de variación (95 % de intervalo de confianza)	SD	Coefficiente de variación (95 % de intervalo de confianza)
Alanina	193 µmol/L	6,90 µmol/L	3,6 % (2,9–4,6 %)	8,02 µmol/L	4,2 % (3,6–5,0 %)
	310 µmol/L	10,4 µmol/L	3,3 % (2,7–4,3 %)	13,7 µmol/L	4,4 % (3,7–5,5 %)
	440 µmol/L	14,4 µmol/L	3,3 % (2,7–4,2 %)	17,7 µmol/L	4,0 % (3,4–4,8 %)
Arginina	48 µmol/L	1,98 µmol/L	4,1 % (3,4–5,3 %)	2,05 µmol/L	4,3 % (3,7–5,1 %)
	66 µmol/L	2,00 µmol/L	3,0 % (2,5–3,8 %)	2,60 µmol/L	3,9 % (3,3–4,7 %)
	93 µmol/L	2,64 µmol/L	2,9 % (2,3–3,7 %)	3,63 µmol/L	3,9 % (3,3–4,9 %)
Ácido aspártico	199 µmol/L	9,16 µmol/L	4,6 % (3,8–5,9 %)	10,1 µmol/L	5,1 % (4,4–6,0 %)
	390 µmol/L	11,0 µmol/L	2,8 % (2,3–3,6 %)	13,5 µmol/L	3,5 % (3,0–4,2 %)

Sustancia	Promedio	Repetitividad		Within-Laboratory Precision	
		SD	Coefficiente de variación (95 % de intervalo de confianza)	SD	Coefficiente de variación (95 % de intervalo de confianza)
	586 µmol/L	15,5 µmol/L	2,6 % (2,2–3,4 %)	22,1 µmol/L	3,8 % (3,2–4,7 %)
Citrulina	45,8 µmol/L	2,03 µmol/L	4,4 % (3,6–5,7 %)	2,06 µmol/L	4,5 % (3,9–5,3 %)
	84,7 µmol/L	2,78 µmol/L	3,3 % (2,7–4,2 %)	3,39 µmol/L	4,0 % (3,4–4,8 %)
	127 µmol/L	7,27 µmol/L	5,7 % (4,7–7,3 %)	7,56 µmol/L	6,0 % (5,2–7,1 %)
	509 µmol/L	16,7 µmol/L	3,3 % (2,7–4,2 %)	31,3 µmol/L	6,2 % (5,0–8,1 %)
Ácido glutámico	915 µmol/L	29,0 µmol/L	3,2 % (2,6–4,1 %)	37,0 µmol/L	4,0 % (3,4–4,9 %)
	1334 µmol/L	32,9 µmol/L	2,5 % (2,0–3,2 %)	54,9 µmol/L	4,1 % (3,4–5,1 %)
Glicina	205 µmol/L	11,7 µmol/L	5,7 % (4,7–7,3 %)	12,9 µmol/L	6,3 % (5,4–7,5 %)
	342 µmol/L	20,0 µmol/L	5,9 % (4,8–7,5 %)	20,9 µmol/L	6,1 % (5,3–7,3 %)
	481 µmol/L	18,6 µmol/L	3,9 % (3,2–4,9 %)	29,6 µmol/L	6,1 % (5,2–7,5 %)
Leucina	191 µmol/L	7,46 µmol/L	3,9 % (3,2–5,0 %)	9,66 µmol/L	5,1 % (4,3–6,2 %)
	325 µmol/L	9,44 µmol/L	2,9 % (2,4–3,7 %)	11,4 µmol/L	3,5 % (3,0–4,2 %)
	456 µmol/L	15,1 µmol/L	3,3 % (2,7–4,2 %)	17,1 µmol/L	3,7 % (3,2–4,5 %)
Metionina	27,7 µmol/L	1,06 µmol/L	3,8 % (3,1–4,9 %)	1,23 µmol/L	4,4 % (3,8–5,3 %)
	45,3 µmol/L	1,53 µmol/L	3,4 % (2,8–4,3 %)	2,02 µmol/L	4,5 % (3,8–5,4 %)
	63,4 µmol/L	1,76 µmol/L	2,8 % (2,3–3,5 %)	2,40 µmol/L	3,8 % (3,2–4,7 %)
Ornitina	225 µmol/L	10,7 µmol/L	4,7 % (3,9–6,0 %)	11,7 µmol/L	5,2 % (4,4–6,2 %)
	363 µmol/L	11,7 µmol/L	3,2 % (2,6–4,1 %)	13,1 µmol/L	3,6 % (3,1–4,3 %)
	506 µmol/L	14,4 µmol/L	2,8 % (2,3–3,6 %)	17,5 µmol/L	3,5 % (2,9–4,2 %)
Fenilalanina	65,6 µmol/L	2,93 µmol/L	4,5 % (3,7–5,7 %)	3,14 µmol/L	4,8 % (4,1–5,7 %)
	121 µmol/L	3,53 µmol/L	2,9 % (2,4–3,7 %)	4,50 µmol/L	3,7 % (3,2–4,5 %)
	176 µmol/L	5,34 µmol/L	3,0 % (2,5–3,9 %)	6,61 µmol/L	3,8 % (3,2–4,5 %)
Prolina	299 µmol/L	9,29 µmol/L	3,1 % (2,5–4,0 %)	13,3 µmol/L	4,5 % (3,7–5,5 %)
	482 µmol/L	16,6 µmol/L	3,4 % (2,8–4,4 %)	19,6 µmol/L	4,1 % (3,5–4,9 %)
	662 µmol/L	20,1 µmol/L	3,0 % (2,5–3,9 %)	25,1 µmol/L	3,8 % (3,2–4,6 %)
Succinilacetona	0,636 µmol/L	0,026 µmol/L	4,1 % (3,3–5,2 %)	0,050 µmol/L	7,9 % (6,4–10,4 %)
	0,976 µmol/L	0,029 µmol/L	3,0 % (2,4–3,8 %)	0,056 µmol/L	5,7 % (4,6–7,7 %)
	1,33 µmol/L	0,048 µmol/L	3,6 % (2,9–4,6 %)	0,065 µmol/L	4,9 % (4,1–6,0 %)
Tirosina	163 µmol/L	5,84 µmol/L	3,6 % (2,9–4,6 %)	7,805 µmol/L	4,8 % (4,0–5,9 %)
	310 µmol/L	9,84 µmol/L	3,2 % (2,6–4,1 %)	10,5 µmol/L	3,4 % (2,9–4,0 %)
	455 µmol/L	12,1 µmol/L	2,7 % (2,2–3,4 %)	19,1 µmol/L	4,2 % (3,5–5,3 %)
Valina	151 µmol/L	5,27 µmol/L	3,5 % (2,9–4,5 %)	6,34 µmol/L	4,2 % (3,6–5,0 %)
	238 µmol/L	8,15 µmol/L	3,4 % (2,8–4,4 %)	10,5 µmol/L	4,4 % (3,7–5,4 %)
	323 µmol/L	10,5 µmol/L	3,2 % (2,7–4,2 %)	13,3 µmol/L	4,1 % (3,5–4,9 %)

Tabla 51: Precisión (repeatability & within-laboratory precision), análisis con espectrómetro de masas SCIEX API 4000™, acilcarnitinas y carnitina libre

Sustancia	Promedio	Repetitividad		Within-Laboratory Precision	
		SD	Coeficiente de variación (95 % de intervalo de confianza)	SD	Coeficiente de variación (95 % de intervalo de confianza)
C0-Carnitina	33,5 µmol/L	1,221 µmol/L	3,6 % (3,0-4,7 %)	1,39 µmol/L	4,1 % (3,6-4,9 %)
	55,8 µmol/L	2,212 µmol/L	4,0 % (3,3-5,1 %)	2,46 µmol/L	4,4 % (3,8-5,3 %)
	76,7 µmol/L	2,373 µmol/L	3,1 % (2,5-4,0 %)	3,38 µmol/L	4,4 % (3,7-5,4 %)
C2-Carnitina	23,8 µmol/L	0,985 µmol/L	4,1 % (3,4-5,3 %)	1,11 µmol/L	4,7 % (4,0-5,6 %)
	48,3 µmol/L	1,592 µmol/L	3,3 % (2,7-4,2 %)	1,93 µmol/L	4,0 % (3,4-4,8 %)
	70,0 µmol/L	2,240 µmol/L	3,2 % (2,6-4,1 %)	3,04 µmol/L	4,3 % (3,7-5,3 %)
C3-Carnitina	2,93 µmol/L	0,132 µmol/L	4,5 % (3,7-5,8 %)	0,145 µmol/L	4,9 % (4,3-5,9 %)
	5,68 µmol/L	0,193 µmol/L	3,4 % (2,8-4,3 %)	0,220 µmol/L	3,9 % (3,3-4,6 %)
	8,32 µmol/L	0,268 µmol/L	3,2 % (2,6-4,1 %)	0,374 µmol/L	4,5 % (3,8-5,6 %)
C4-Carnitina	0,378 µmol/L	0,020 µmol/L	5,3 % (4,3-6,8 %)	0,022 µmol/L	5,9 % (5,1-7,0 %)
	0,718 µmol/L	0,026 µmol/L	3,7 % (3,0-4,7 %)	0,030 µmol/L	4,2 % (3,6-5,1 %)
	1,14 µmol/L	0,039 µmol/L	3,4 % (2,8-4,4 %)	0,049 µmol/L	4,3 % (3,7-5,1 %)
C5-Carnitina	0,219 µmol/L	0,011 µmol/L	5,1 % (4,2-6,5 %)	0,012 µmol/L	5,5 % (4,7-6,5 %)
	0,409 µmol/L	0,013 µmol/L	3,2 % (2,6-4,1 %)	0,016 µmol/L	3,9 % (3,4-4,7 %)
	0,591 µmol/L	0,019 µmol/L	3,2 % (2,6-4,1 %)	0,025 µmol/L	4,3 % (3,6-5,1 %)
C5DC-Carnitina	0,582 µmol/L	0,043 µmol/L	7,4 % (6,1-9,5 %)	0,056 µmol/L	9,7 % (8,2-11,8 %)
	0,92 µmol/L	0,066 µmol/L	7,1 % (5,8-9,1 %)	0,085 µmol/L	9,2 % (7,8-11,1 %)
	1,32 µmol/L	0,101 µmol/L	7,7 % (6,3-9,8 %)	0,124 µmol/L	9,4 % (8,0-11,3 %)
C6-Carnitina	0,079 µmol/L	0,005 µmol/L	6,3 % (5,1-8,0 %)	0,006 µmol/L	7,4 % (6,3-8,9 %)
	0,194 µmol/L	0,008 µmol/L	2,9 % (2,6-4,1 %)	0,011 µmol/L	4,0 % (3,7-5,2 %)
	0,275 µmol/L	0,008 µmol/L	2,9 % (2,4-3,8 %)	0,011 µmol/L	4,0 % (3,4-4,9 %)
C8-Carnitina	0,109 µmol/L	0,007 µmol/L	6,4 % (5,3-8,2 %)	0,007 µmol/L	6,8 % (5,8-8,0 %)
	0,187 µmol/L	0,006 µmol/L	3,3 % (2,7-4,2 %)	0,008 µmol/L	4,3 % (3,6-5,2 %)
	0,281 µmol/L	0,010 µmol/L	3,5 % (2,8-4,4 %)	0,013 µmol/L	4,6 % (3,9-5,5 %)
C10-Carnitina	0,152 µmol/L	0,009 µmol/L	5,8 % (4,7-7,4 %)	0,009 µmol/L	5,9 % (5,1-7,0 %)
	0,270 µmol/L	0,009 µmol/L	3,4 % (2,8-4,4 %)	0,011 µmol/L	4,2 % (3,6-5,1 %)
	0,392 µmol/L	0,013 µmol/L	3,3 % (2,7-4,2 %)	0,016 µmol/L	4,1 % (3,5-5,0 %)
C12-Carnitina	0,136 µmol/L	0,009 µmol/L	6,5 % (5,3-8,3 %)	0,009 µmol/L	6,9 % (5,9-8,2 %)
	0,266 µmol/L	0,011 µmol/L	4,0 % (3,3-5,1 %)	0,013 µmol/L	4,8 % (4,0-5,8 %)
	0,380 µmol/L	0,013 µmol/L	3,5 % (2,8-4,4 %)	0,018 µmol/L	4,8 % (4,1-5,8 %)
C14-Carnitina	0,215 µmol/L	0,011 µmol/L	5,3 % (4,4-6,8 %)	0,013 µmol/L	6,3 % (5,4-7,5 %)
	0,404 µmol/L	0,019 µmol/L	4,6 % (3,8-5,9 %)	0,023 µmol/L	5,8 % (4,9-7,1 %)
	0,642 µmol/L	0,021 µmol/L	3,3 % (2,7-4,2 %)	0,030 µmol/L	4,6 % (3,9-5,6 %)
C16-Carnitina	2,87 µmol/L	0,142 µmol/L	5,0 % (4,1-6,3 %)	0,209 µmol/L	7,3 % (6,0-9,2 %)

Sustancia	Promedio	Repetitividad		Within-Laboratory Precision	
		SD	Coefficiente de variación (95 % de intervalo de confianza)	SD	Coefficiente de variación (95 % de intervalo de confianza)
C18-Carnitina	5,66 µmol/L	0,257 µmol/L	4,5 % (3,7–5,8 %)	0,355 µmol/L	6,3 % (5,2–7,9 %)
	8,11 µmol/L	0,326 µmol/L	4,0 % (3,3–5,1 %)	0,436 µmol/L	5,4 % (4,6–6,5 %)
	0,984 µmol/L	0,049 µmol/L	5,0 % (4,1–6,3 %)	0,101 µmol/L	10,3 % (8,2–13,8 %)
	1,93 µmol/L	0,097 µmol/L	5,0 % (4,1–6,4 %)	0,150 µmol/L	7,8 % (6,3–10,1 %)
	2,70 µmol/L	0,108 µmol/L	4,0 % (3,3–5,1 %)	0,169 µmol/L	6,3 % (5,3–7,7 %)

Deriva (Drift)

Para poder determinar la deriva de la concentración de analitos a lo largo del tiempo, se comparó la concentración de todos los analitos en los tres controles empleados a lo largo de 20 días. No se observó deriva en ninguno de los analitos.

Contaminación (carry-over)

Se midió una muestra con concentraciones de analitos en el rango de medición superior y directamente a continuación una muestra en blanco. No se determinaron concentraciones por encima del límite inferior de análisis (LLOQ) salvo para los analitos abajo indicados. Las concentraciones de analitos en la muestra en blanco, producto de una contaminación, se indicaron de forma porcentual con respecto a los de la muestra anterior.

Tabla 52: Tasa de contaminación (carry-over rate)

Sustancia	Sistema ACQUITY™ UPLC® acoplado a un espectrómetro de masas Waters® TQD™	Sistema Shimadzu LC-20A Prominence HPLC acoplado a un espectrómetro de masas SCIEX 4000™
	Tasa de contaminación (carry-over rate)	Tasa de contaminación (carry-over rate)
Arginina	0,46 %	1,78 %
Ácido aspártico	< LLOQ	0,76 %
Citrulina	< LLOQ	0,34 %
Glicina	< LLOQ	0,31 %
Leucina	< LLOQ	0,42 %
Ornitina	2,18 %	4,19 %
Fenilalanina	< LLOQ	0,19 %
Prolina	0,36 %	0,72 %
C2 Carnitina	0,01 %	< LLOQ
C4-Carnitina	< LLOQ	0,18 %
C5-Carnitina	< LLOQ	0,17 %
C8-Carnitina	< LLOQ	0,11 %
C10-Carnitina	< LLOQ	0,21 %
C14-Carnitina	< LLOQ	0,18 %
C16-Carnitina	< LLOQ	0,31 %
C18-Carnitina	< LLOQ	0,16 %

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.

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 53: Rangos de tolerancia - sistema HPLC

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

Hay que optimizar el gradiente de flujo en función del volumen de inyección.

Tabla 54: Rangos de tolerancia - preparación de la muestra

Preparación de la muestra	Rango de tolerancia
Extracción de las aminoácidos y acilcarnitinas (capítulo 5.5.2, pasos 2 y 3)	
Duración de la incubación	15–25 min
Velocidad de agitado	500–700 rpm, en orbit de 2 mm
Velocidad de centrifugado	2200 x g durante 10 min
	3000 x g durante 5 min
Extracción de la succinilacetona (capítulo 5.5.2, pasos 4 y 5)	
Temperatura de extracción	40–50 °C
Duración de la incubación	30–35 min
Velocidad de agitado	400–600 rpm, en orbit de 2 mm
Velocidad de centrifugado	2600–3000 x g durante 2 min
	2200 x g durante 5 min
Incubación (capítulo 5.5.2, paso 6)	
Condiciones de incubación	45–60 min a 45 °C y 400 rpm, en orbit de 2 mm

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 55: 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