

VMA, 5-HIAA y HVA EN ORINA POR LC/MS

Código LC14610





Este producto cumple todos los requisitos de la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro (DIV).

La declaración de conformidad (CE) está disponible previa solicitud.



EUREKA S.R.L. LAB DIVISION
Via M. D'Antona 28
60033 Chiaravalle (AN) - Italy
Tel +39 071 7450790
eureka-support@sentinel.it
www.eurekakit.com

INTRODUCCIÓN

La Epinefrina (E), la norepinefrina (NE) y la dopamina son los miembros más importantes de esta familia.

La vía biosintética de las catecolaminas utiliza **L-tirosina** como sustrato inicial. Las células cromafines sintetizan y almacenan epinefrina en la médula suprarrenal, mientras que la producción de norepinefrina tiene lugar en las terminaciones nerviosas simpáticas. La dopamina es sobre todo un neurotransmisor en el SNC.

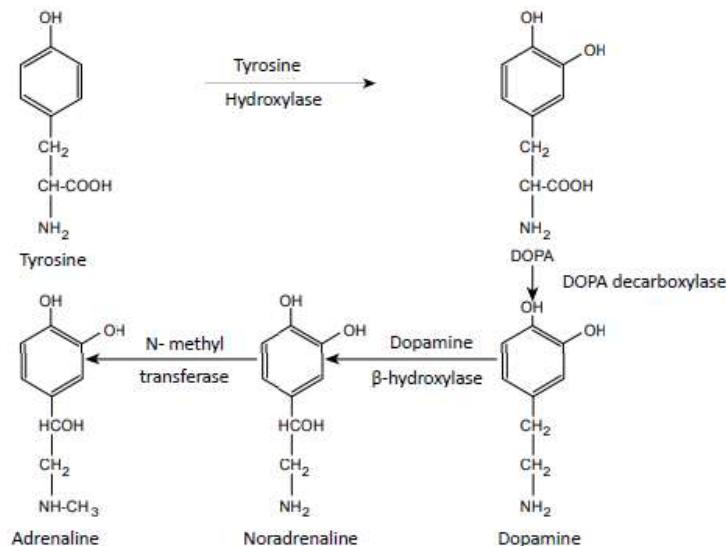


Fig 1. Biosynthesis of catecholamines

CATABOLISMO

Los efectos biológicos de las catecolaminas terminan rápidamente por absorción en las terminaciones nerviosas simpáticas. Los principales cambios que se producen en estas zonas incluyen su transformación en metabolitos meta-O-metilados y desaminados debido a la **Catecol-O-metiltransferasa (COMT)** y la **monoaminoxidasa (MAO)** respectivamente y, por último, su conjugación con sulfato y glucurónido.

El ácido homovanílico es el principal metabolito de la **Dopamina** mientras que el **ácido vanilmandélico** es el principal metabolito de la norepinefrina y la epinefrina. (fig. 2)

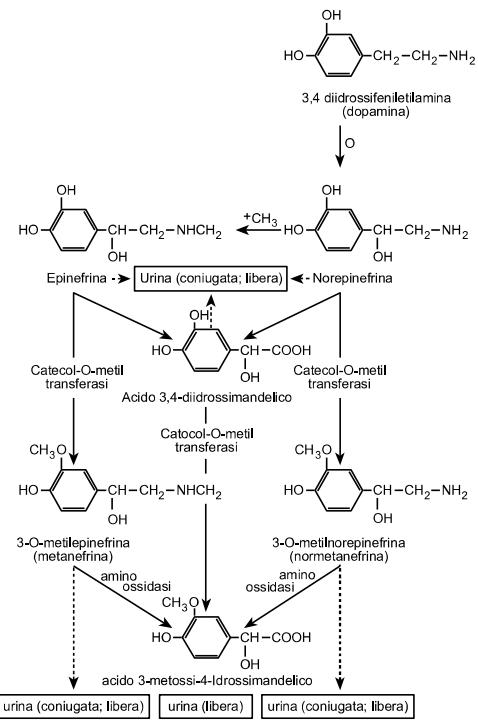


Figura 2: Metabolismo degli ormoni della midollare del surrene

Fig. 2: Metabolismo de las hormonas de la médula suprarrenal

CONTEXTO CLÍNICO

Las catecolaminas se determinan a menudo en orina para el diagnóstico neurológico y para el seguimiento de la respuesta al tratamiento en enfermedades como el **feocromocitoma** y el **neuroblastoma**.

El **feocromocitoma** es un tumor productor de catecolaminas que procede de las células cromafines de la médula adrenal. Más del 90% parecen ser benignos. Son peligrosos por su capacidad para almacenar y liberar catecolaminas en grandes cantidades, con la consiguiente producción de síndromes alarmantes que incluyen hipertensión sostenida, resistente al tratamiento convencional, y crisis hipertensivas con hipertensión maligna y encefalopatía hipertensiva. El diagnóstico del feocromocitoma se establece mediante la demostración de un aumento de la excreción urinaria de catecolaminas o metabolitos de catecolaminas, y a menudo se determina su concentración en orina para controlar la respuesta al tratamiento. El feocromocitoma es curable si se diagnostica y trata correctamente, pero es mortal si se diagnostica o trata incorrectamente.

El neuroblastoma, el segundo tumor sólido más frecuente en la infancia, puede aparecer casi en cualquier punto de la cadena del sistema nervioso simpático. Este tumor sintetiza y secreta catecolaminas y metabolitos como DOPA, dopamine, VMA y ácido homovanílico. La evaluación de las catecolaminas urinarias y plasmáticas es útil para establecer un diagnóstico y seguir los resultados del tratamiento.

CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La muestra se diluyó y se inyectó en el LC-MS/MS.

RECUPERACIÓN:	52,8 – 84,4%		
SENSIBILIDAD (LLOD):	Ácido vanilmandélico	0,008 mg/L	
	Ácido 5-hidroxiindolacético	0,01 mg/L	
	Ácido homovanílico	0,03 mg/L	
CONCENTRACIÓN MÍNIMA ANALIZABLE (LLOQ):	Ácido vanilmandélico	0,02 mg/L	
	Ácido 5-hidroxiindolacético	0,04 mg/L	
	Ácido homovanílico	0,1 mg/L	
LINEALIDAD:	Ácido vanilmandélico	0,02 - 250 mg/L	
	Ácido 5-hidroxiindolacético	0,04 - 250 mg/L	
	Ácido vanilmandélico	0,1 - 250 mg/L	
VALORES NORMALES EN ORINA DE 24 H:	Ácido vanilmandélico	1,8 – 6,7 mg/24 h	
	Ácido 5-hidroxiindolacético	0,5 – 8,2 mg/24 h	
	Ácido homovanílico	0,5 – 6,2 mg/24 h	
Precisión intraserial (error relativo %) Ácido vanilmandélico:	Ci	Cs	
	0,4 mg/l	8,2 mg/l	
	11,79%	5,19%	
Precisión interserial (error relativo %) Ácido vanilmandélico:	Ci	Cs	
	0,4 mg/l	8,2 mg/l	
	10,61%	4,75%	
Reproducibilidad intraserial (coeficiente de variación %) Ácido vanilmandélico:	C LLOQ	Cm	CUP
	0,02 mg/l	1,8 mg/l	13,9 mg/l
	2,17%	4,32%	2,56%
Reproducibilidad interserial (coeficiente de variación %) Ácido vanilmandélico:	C LLOQ	Cm	CUP
	0,02 mg/l	1,8 mg/l	13,9 mg/l
	8,32%	5,86%	6,05%
Precisión intraserial (error relativo %) Ácido 5-hidroxiindolacético:	Ci	Cs	
	0,4 mg/l	9,8 mg/l	
	7,48%	4,40%	
Precisión interserial (error relativo %) Ácido 5-hidroxiindolacético:	Ci	Cs	
	0,4 mg/l	9,8 mg/l	
	5,06%	3,47%	
Reproducibilidad intraserial (coeficiente de variación %) Ácido 5-hidroxiindolacético:	C LLOQ	Cm	CUP
	0,04 mg/l	1,6 mg/l	13,5 mg/l
	7,97%	2,24%	0,43%

Reproducibilidad interserial (coeficiente de variación %) Ácido 5-hidroxiindolacético:	C LLOQ	Cm	CUP
	0,04 mg/l	1,6 mg/l	13,5 mg/l
	5,37%	4,98%	3,11%
Precisión intraserial (error relativo %) Ácido homovanílico:	Ci	Cs	
	1,0 mg/l	5,3 mg/l	
	7,12%	9,38%	
Precisión interserial (error relativo %) Ácido homovanílico:	Ci	Cs	
	1,0 mg/l	5,3 mg/l	
	8,25%	7,08%	
Reproducibilidad intraserial (coeficiente de variación %) Ácido homovanílico:	C LLOQ	Cm	CUP
	0,1 mg/l	2,6 mg/l	14,4 mg/l
	7,97%	2,64%	1,21%
Reproducibilidad interserial (coeficiente de variación %) Ácido homovanílico:	C LLOQ	Cm	CUP
	0,1 mg/l	2,6 mg/l	14,4 mg/l
	6,36%	3,53%	1,71%
Coeficiente de Correlación R2 + Desv. est.:	0,9974 ± 0,0003 Ácido vanilmandélico 0,9970 ± 0,0007 Ácido 5-hidroxiindolacético 0,9981 ± 0,0013 Ácido homovanílico		

COMPONENTES DEL KIT (100 PRUEBAS)

Reactivos A – Solución de patrón interno	1 x 2 ml	Almacenar a -20 °C
Reactivos B – Solución de dilución	1 x 20 ml	
Calibrador en orina – Nivel 0	2 x 1 ml	Código LC77016 (Embalado por separado - ver ficha técnica)
Calibrador en orina – Nivel 1	2 x 1 ml	Código LC77016 (Embalado por separado - ver ficha técnica)
Calibrador en orina – Nivel 2	2 x 1 ml	Código LC77016 (Embalado por separado - ver ficha técnica)
Calibrador en orina – Nivel 3	2 x 1 ml	Código LC77016 (Embalado por separado - ver ficha técnica)
Calibrador en orina – Nivel 4	2 x 1 ml	Código LC77016 (Embalado por separado - ver ficha técnica)
Calibrador en orina – Nivel 5	2 x 1 ml	Código LC77016 (Embalado por separado - ver ficha técnica)
Calibrador en orina – Nivel 6	2 x 1 ml	Código LC77016 (Embalado por separado - ver ficha técnica)
Reactivos M1 – Fase móvil M1	1 x 500 ml	
Reactivos M2 – Fase móvil M2	2 x 500 ml	

Todos los reactivos están listos para su uso y son estables 3 años a 2-8 °C,
excepto el Reactivo A que debe conservarse a -20 °C.

El método de conservación del patrón de calibración liofilizado se describe en la ficha técnica correspondiente.

ACCESORIOS Y CONSUMIBLES

CÓDIGO	DESCRIPCIÓN	EMBALAJE
LC77016	Calibrador en orina para aminas biogénicas	7 x 2 x 1 ml
LC77019	Control en orina para aminas biogénicas - Niveles 1, 2 y 3	3 x 5 x 1 ml
SK14610	Kit de inicio para VMA/HVA/5-HIAA en orina	1 Ud
Z959757902	Columna analítica Zorbax RRHD C18 (50 x 2,1 mm, 1,8 um)	1 Ud

Bibliografía

- 1- Clinica Chimica Acta 398 53-56 ' HPLC-mass spectrometry method for quantitative detection of neuroendocrine tumor markers: Vanilmandelic acid, homovanillic acid and 5-hydroxyindoleacetic acid.'
- 2- JALM 01:04 387-399 'Practical LC-MS/MS Method for 5-Hydroxyindoleacetic acid in urine'
- 3- Current Opinions in Biotechnology 2017, 43:34-40 'The future of NMR-based metabolomics'

Chimica Clinica Acta, accepted manuscript 'Simple dilute-and-shot method for urinary vanilmandelic and homovanillic acid by liquid chromatography tandem mass spectrometry'

EQUIPO INSTRUMENTAL MÍNIMO NECESARIO

LC-MS/MS con TRIPLE CUADRUPOLO con bomba binaria
modo MRM, ESI negativo

EQUIPOS OPCIONALES

Automuestreador
Ordenador operativo

PROCEDIMIENTO DE RECOGIDA DE ORINA DE 24 H

La orina de 24 horas debe recogerse en un recipiente con 5 ml (Niño) o 10 ml (Adulto) de HCl 5 M por cada litro de orina. Después de la recolección, 10 ml de orina deben ser entregados al laboratorio con la indicación de la diuresis total. **El laboratorio debe verificar que la orina entregada tenga un pH entre 2,5 y 3,5. Si el pH es > 7 la muestra puede no ser adecuada para el análisis.** Los análisis diferidos requieren la congelación de la muestra a -20°C o menos. Estable durante más de 2 meses.

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

PASO

Dispensar en un vial:

- 180 µl de **Reactivo B – Solución de dilución**
- 20 µl de **Reactivo A – Solución de patrón interno**
- 20 µl de **Calibrador (C0-C6)/Controles/Muestras**

Agitar en el vortex durante 10 seg.

N.B.: en este paso la muestra es estable durante 2 días a 2-8 °C

INYECCIÓN

- Inyectar 2 µl de solución en el sistema HPLC.

HVA, 5-HIAA y VMA en LC/MS - Advertencias

ACONDICIONAMIENTO DE LA COLUMNA

Instalar la nueva columna analítica Zorbax RRHD C18 (50 x 2,1 mm, 1,8 um), termostatizada a 60 °C. Desconectar el detector y fundir una solución de Fase Móvil M2: Fase móvil M1 (90: 10 v/v) ajustar el flujo a 400 ul / minuto durante 20 minutos. Acondicionar la columna con una solución de fase móvil M2: Fase móvil M1 (90: 10 v/v) ajustar el flujo a 400 ul / minuto durante 15 minutos. Acondicionar la columna con una solución de fase móvil M2 y ajustar el flujo a 400 ul/minuto durante 15 minutos. **Dos inyecciones al 50% de agua grado HPLC/50 % de acetonitrilo antes de proceder a la serie analítica.**

NO es posible hacer análisis en fase de reciclado.

Si la temperatura ambiente es > de 20 °C, almacenar la fase móvil a 2-8 °C entre una sesión analítica y otra.

LIMPIEZA Y ALMACENAMIENTO DE COLUMNAS

Lavar con una solución de fase móvil M2: Fase móvil M1 (90: 10 v/v) ajustar el flujo a 400 ul / minuto durante 20 minutos. Almacenar la columna en esta solución.

LAVADO DE LA AGUJA DE INYECCIÓN

Lavar con una solución de metanol: H₂O (85: 15 v/v).

PARÁMETROS AJUSTADOS EN WATERS XEVO TQS MICRO

Tensión de capilar (kV)	3,0
Gas de desolvatación (l/hora)	1000
Temperatura de desolvatación (°C)	600
Temperatura de origen (°C)	150

Fragmentaciones (optimizado en TRIPLE CUADRUPOLO WATERS XEVO TQS MICRO)

Analito	Transiciones MRM m/z	ENERGÍA DE COLISIÓN
HVA	181.0>121.9	15
5-HIAA	190>145.9	5
VMA	197.0>137.9	10
HVA-D5	186.0>142.0	6
5-HIAA-13C6	196.0>152.0	10
VMA-D3	200.0>137.0	18

GRADIENTE

Tiempo (min)	% M1 (BOMBA A)	% M2 (BOMBA B)	FLUJO (μl/min)
0	100	0	400
0,5	100	0	400
3,5	70	30	400
3,51	0	100	400
4,50	0	100	400
4,51	100	0	400
6,0	100	0	400

VMA, 5-HIAA y HVA BY LC/MS

(Cromatogramas de referencia)

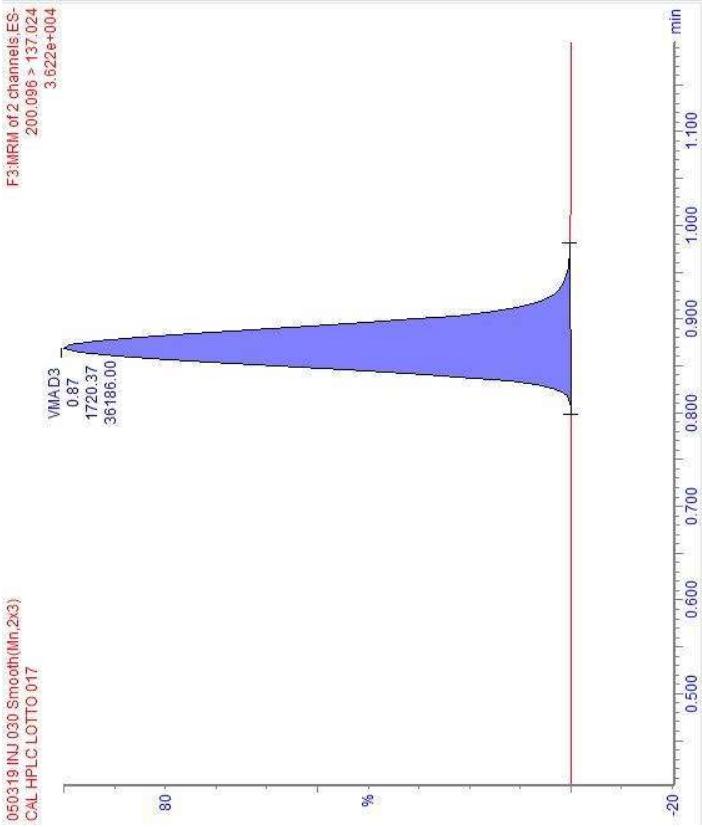
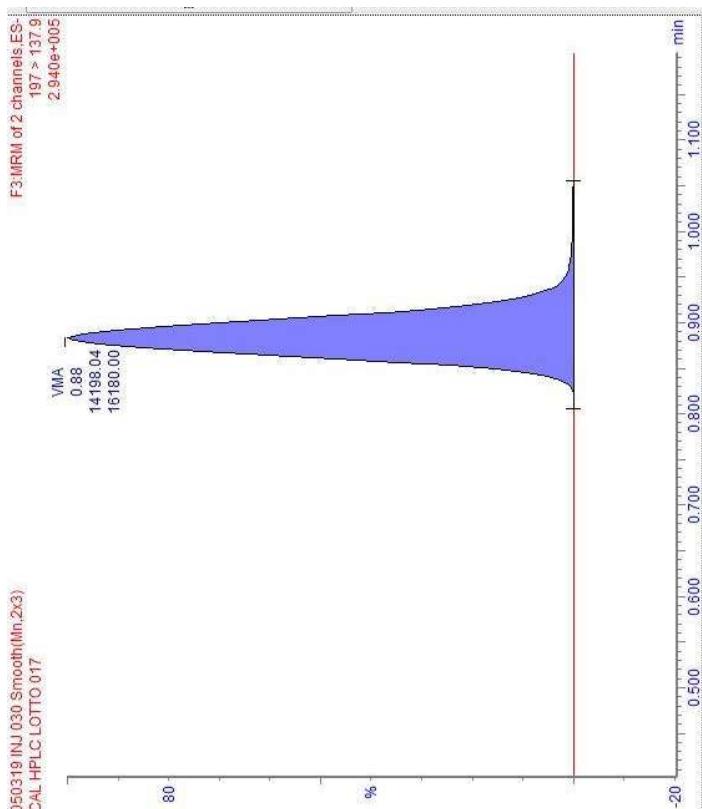
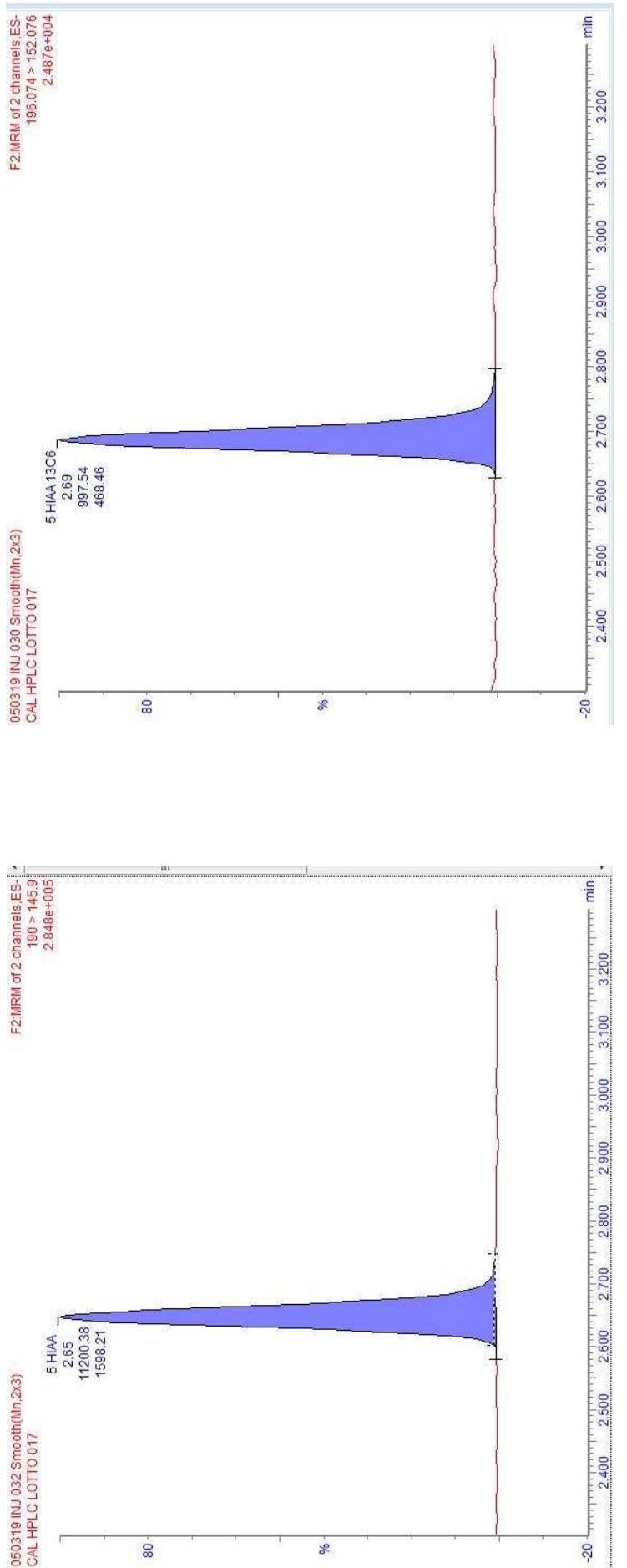


Fig. 3: Calibrador orina
R.T. 0,88 VMA

Fig. 4: Calibrador orina
R.T. 0.87 VMA-D3

VMA, 5-HIAA y HVA BY LC/MS

(Cromatogramas de referencia)



VMA, 5-HIAA y HVA BY LC/MS

(Cromatogramas de referencia)

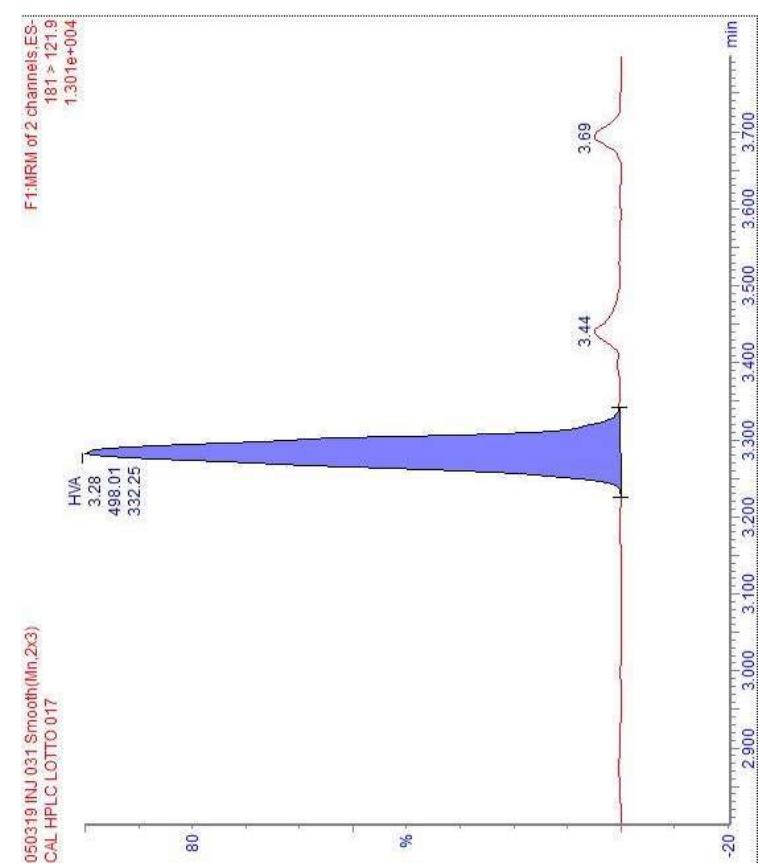


Fig. 7: **Calibrador orina**

R.T. 3.28	HVA
R.T. 3.44	5-HIAA
R.T. 3.69	VMA

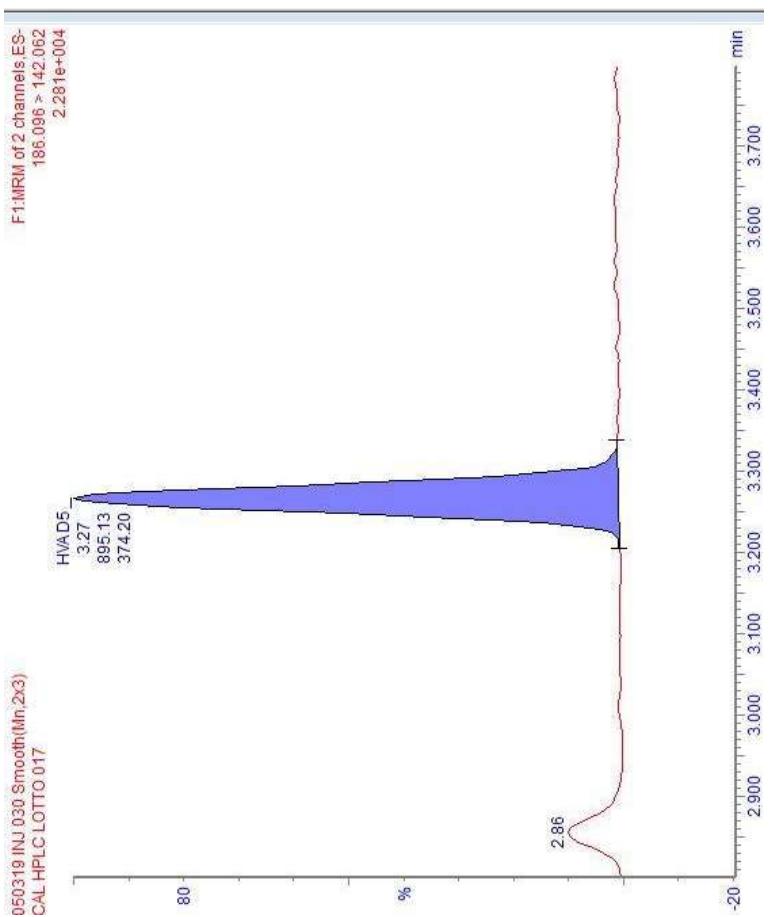
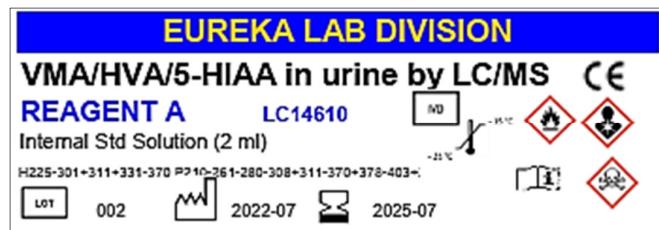
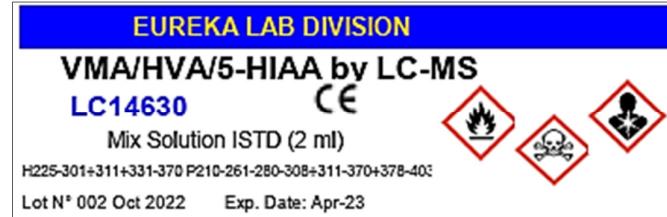


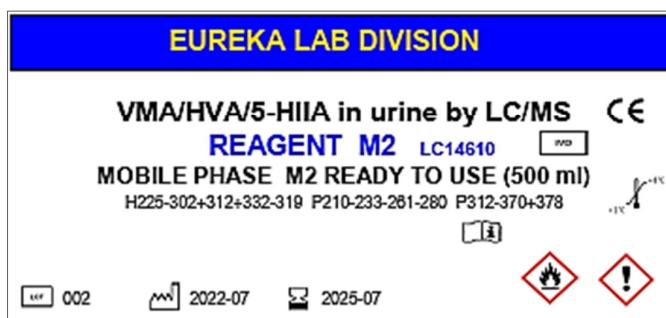
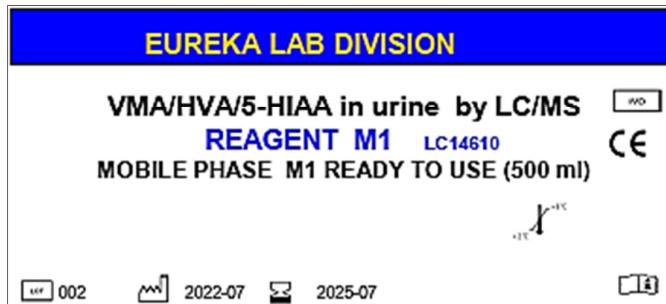
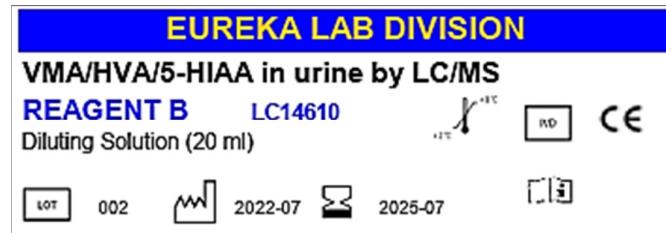
Fig. 8: **Calibrador orina**

R.T. 3.27	HVA-D5
-----------	--------

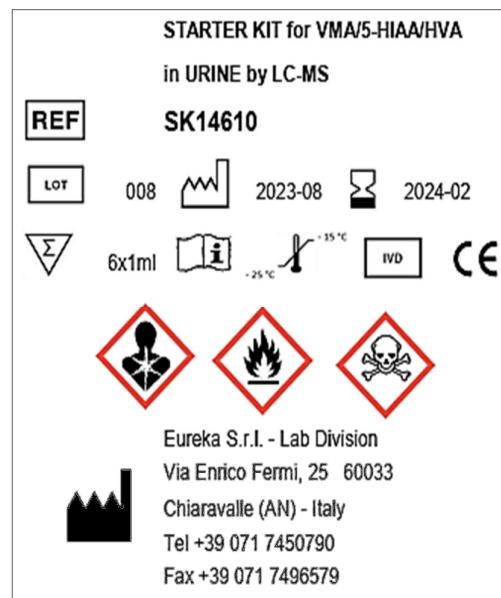
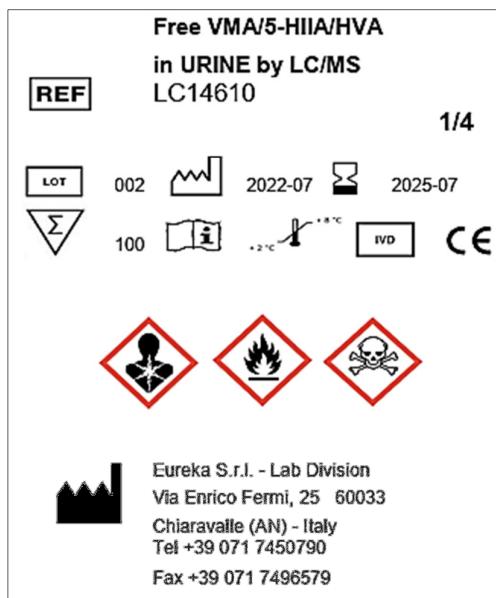
ROTULOS INTERNOS

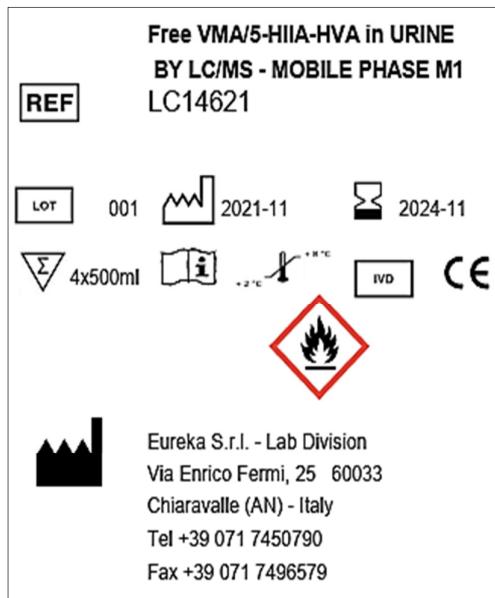
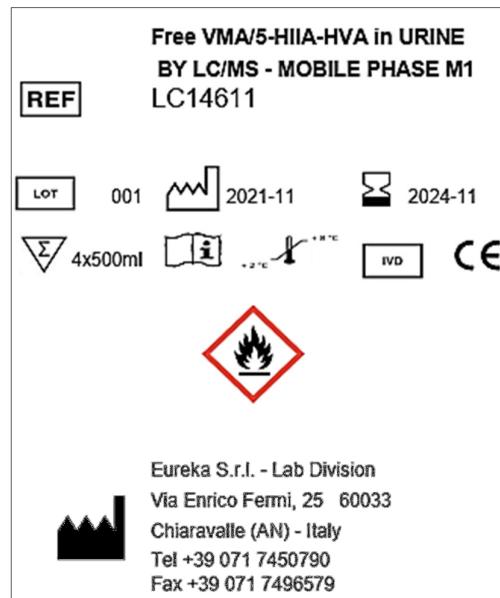
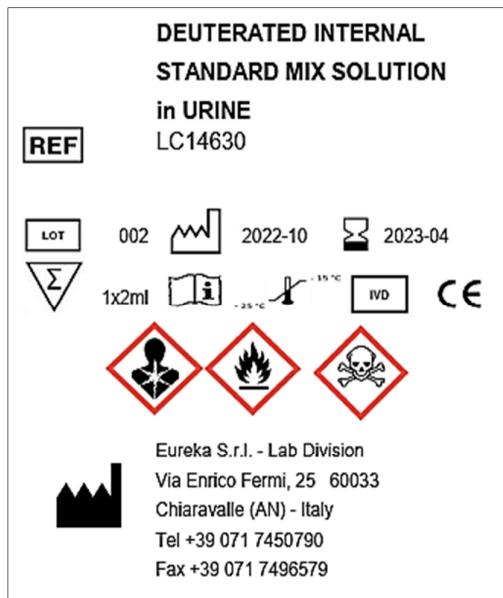
<p>Free VMA/5-HIIA/HVA in URINE by LC/MS LC14610</p> <p>REF</p> <p style="text-align: right;">1/4</p> <p>LOT 002 2022-07 2025-07 100 +2°C </p> <p></p> <p> Eureka S.r.l. - Lab Division Via Enrico Fermi, 25 60033 Chiaravalle (AN) - Italy Tel +39 071 7450790 Fax +39 071 7496579</p>	<p>Free VMA/5-HIIA-HVA in URINE BY LC/MS - MOBILE PHASE M1 LC14611</p> <p>REF</p> <p>LOT 001 2021-11 2024-11 4x500ml +2°C </p> <p></p> <p> Eureka S.r.l. - Lab Division Via Enrico Fermi, 25 60033 Chiaravalle (AN) - Italy Tel +39 071 7450790 Fax +39 071 7496579</p>
<p>Free VMA/5-HIIA-HVA in URINE BY LC/MS - MOBILE PHASE M1 LC14621</p> <p>REF</p> <p>LOT 001 2021-11 2024-11 4x500ml +2°C </p> <p></p> <p> Eureka S.r.l. - Lab Division Via Enrico Fermi, 25 60033 Chiaravalle (AN) - Italy Tel +39 071 7450790 Fax +39 071 7496579</p>	<p>STARTER KIT for VMA/5-HIIA/HVA in URINE by LC-MS SK14610</p> <p>REF</p> <p>LOT 008 2023-08 2024-02 6x1ml -25°C </p> <p></p> <p> Eureka S.r.l. - Lab Division Via Enrico Fermi, 25 60033 Chiaravalle (AN) - Italy Tel +39 071 7450790 Fax +39 071 7496579</p>





ROTULOS EXTERNOS





ROTULADO IMPORTADOR

Producto: EUREKA - Kit de reactivos para la determinación de VMA, 5-HIAA y HVA en orina por LC/MS

Fabricante: Eureka srl - Lab Division, Via Enrico Ferini, 25 / Via M. D'Antona, 28 - 60033 Chiaravalle (AN), Italia.

Importador: EXSA S.R.L.; Bernardo Ader N° 3620, Villa Adelina, Vicente López, Provincia de Buenos Aires.

D.T.: Farmacéutica Liliana Parodi, MN 9357

No utilizar si el producto se encuentra dañado o abierto.

USO PROFESIONAL EXCLUSIVO - Autorizado por la ANMAT PM 1489-65

LILIANA E. PARODI
FARMACEUTICA
MAT. 8357

EZEQUIEL BOEZIO
SOCIO-GERENTE



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
AÑO DE LA RECONSTRUCCIÓN DE LA NACIÓN ARGENTINA

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número:

Referencia: Rotulo e instrucciones de uso-EXSA S R L

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 17 pagina/s.