

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS
Y ACILCARNITINAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM PARA TAMIZAJE NEONATAL AMPLIADO.

Guía de Procedimiento para Determinación de Aminoácidos y Acilcarnitinas por Espectrometría de Masas en Tándem Para Tamizaje neonatal ampliado.



Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:
Equipo Laboratorio de Bioquímica Especializada del Servicio de Patología Clínica.	Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento Unidad de Gestión de la Calidad	Dr. Antonio Ricardo Zopfi Rubio Director del Instituto a Nacional de Salud del Niño San Borja

Fecha: Marzo 2019	Código: GP-010/INSN-SB/USDXT- V.01	Página 1 de 30
-------------------	---------------------------------------	----------------

Guía de Procedimiento para Determinación de Aminoácidos y Acilcarnitinas por Espectrometría de Masas en Tándem Para Tamizaje neonatal ampliado.

I.	Título	3
II.	Finalidad	3
III.	Objetivos	3
	a. Objetivo General	3
	b. Objetivo Específico	3
IV.	Ámbito de aplicación	3
V.	Nombre del Proceso o Procedimiento a Estandarizar y Código CPT	3
VI.	Consideraciones Generales	4
	a. Definiciones Operativas	4
	1. Definición del Procedimiento	4
	2. Consentimiento Informado.....	4
	b. Conceptos Básicos	4
	c. Requerimientos Básicos.....	5
VII.	Consideraciones Específicas	6
	a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento:.....	6
	b. Indicaciones.....	21
	1. Indicaciones Absolutas	21
	2. Indicaciones Relativas	21
	c. Riesgos o Complicaciones Frecuentes:.....	21
	d. Contraindicaciones.....	22
VIII.	Recomendaciones	22
IX.	Autores, Fecha y Lugar.....	22
X.	Bibliografía.....	22
XI.	Anexos.....	25

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS
Y ACILCARNITINAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM PARA TAMIZAJE NEONATAL AMPLIADO.

Guía de Procedimiento para Determinación de Aminoácidos y Acilcarnitinas por Espectrometría de Masas en Tándem para Tamizaje neonatal ampliado.

I. Título

Determinación de Aminoácidos y Acilcarnitinas por espectrometría de masas en tándem (MS/MS) para tamizaje neonatal ampliado.

II. Finalidad

Documentar los procedimientos técnicos, preanalíticos, analíticos y postanalíticos en la determinación de aminoácidos y acilcarnitinas en el tamizaje neonatal ampliado.

III. Objetivos

a. Objetivo General

Estandarizar procedimiento para Tamizaje Neonatal ampliado, para determinaciones de aminoácidos y acilcarnitinas.

b. Objetivo Específico

b.1 Estandarizar el procedimiento para la determinación de aminoácidos en sangre seca en papel de filtro por espectrometría de masas en tándem para el tamizaje neonatal ampliado (errores innatos del metabolismo).

b.2 Estandarizar el procedimiento para la determinación de acilcarnitinas en sangre seca en papel de filtro por espectrometría de masas en tándem para el tamizaje neonatal ampliado (errores innatos del metabolismo).

IV. Ámbito de aplicación

El presente procedimiento será aplicado por el área de Bioquímica Especializada del Instituto Nacional del Niño - San Borja.

V. Nombre del Proceso o Procedimiento a Estandarizar y Código CPT

Tamizaje Neonatal de Aminoácidos y Acilcarnitinas.

Código CPT: 80099.01

VI. Consideraciones Generales

a. Definiciones Operativas

1. Definición del Procedimiento

Medición cuantitativa de la presencia de aminoácidos y acilcarnitinas en muestras de sangre seca neonatal, empleando técnica de espectrometría de masas en tándem.

2. Consentimiento Informado

Ver Anexo N° 01

b. Conceptos Básicos

- Acilcarnitinas: Las carnitinas son derivados de aminoácidos que tienen un rol central en el transporte de la energía a partir del metabolismo de los ácidos grasos. Al unirse a determinada molécula llamada AcilCoA se forman las acilcarnitinas. Ante la deficiencia de un grupo de enzimas encargadas de dividir la acilcarnitina, éste compuesto se acumula, aumentando sus niveles y dañando entre otros, tejidos musculares y del sistema nervioso.
- Aminoácidos: Son la unidad mínima bioquímica que forman las proteínas. Existen alrededor de 20 en el humano y de ellos, se consideran 10 esenciales, es decir, deben ser consumidos debido a que no es posible sintetizarlos. En la determinación de éstos en sangre seca neonatal, se intenta cuantificar su presencia y descartar valores altos cuya acumulación podría conducir a daños neurológicos irreversibles.
- Errores innatos del metabolismo: Grupo de enfermedades de baja frecuencia, pero cuyas consecuencias de no ser detectadas acarrear lesiones irreversibles, sobretudo en el área neurológica. Las causas son variadas y generalmente asociadas a déficits congénitos o innatos que afectan una serie de procesos químicos, todos ellos relacionados a procesos metabólicos.
- Espectrometría de masas: Técnica de laboratorio muy sensible que permite detectar e identificar pequeñas moléculas dentro de una sustancia o muestra, valiéndose de la masa y carga eléctrica inherentes y específicos de cada una de estas moléculas. En el caso presente, la técnica permite cuantificar y separar los distintos aminoácidos y acilcarnitinas cuyas representaciones en forma de picos (espectrograma) es característico de cada uno de ellos.
- Tamizaje neonatal: Procedimiento de evaluación y detección de trastornos congénitos (entre ellos los errores innatos del metabolismo) que pueden causar daños irreversibles o incluso mortales.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS
Y ACILCARNITINAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM PARA TAMIZAJE NEONATAL AMPLIADO.

- Se practica utilizando sangre de recién nacidos, obtenida del talón y depositada en forma de gotas en círculos diseñados en tarjetas acondicionadas para este fin. Lo usual es realizar la toma de muestra posterior al inicio de la lactancia materna y el número de analitos a detectar hará la diferencia entre un tamizaje básico (4 a 5 analitos) y otro ampliado, cuya capacidad de análisis sobrepasa la detección de más de 20 patologías asociadas.

c. Requerimientos Básicos

Recursos Humanos

- Médico patólogo Clínico capacitado y entrenado en técnicas de espectrometría de Masa.
- Químico especialista capacitado y entrenado en Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y Espectrometría de Masas (EM)
- Técnico de Laboratorio capacitado y entrenado en procedimientos de Toma de Muestra en Tamizaje Neonatal.

Equipos Biomédicos.

- Espectrómetro de Masa en tándem (3200Q Trap).
- Software de cálculo.
- Sistema de HPLC:
- Desgasificador de alto rendimiento 1260 Infinity.
- Bomba Binaria 1260 infinity .
- Inyector automático de alto rendimiento 1260 Infinity.
- Compartimento de columna termostatzado 1290 Infinity.
- Bandeja de Solventes.
- Perforador Automático Hudson para puncionar la muestra (3 mm diámetro).
- Balanza Analítica de alta precisión.
- Un agitador de placas para la extracción de la muestra 20-600rpm.
- Refrigeradora de Reactivos de 2-8°C.
- Conservadora de -20°C.
- Rotador digital 20-250 rpm.
- Vortex.
- Pipeta Automática.
- Computadora.
- Impresora.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS
Y ACILCARNITINAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM PARA TAMIZAJE NEONATAL AMPLIADO.

Materiales Médicos no Fungibles.

- Rodillo de cierre de goma para sellar las placas con las láminas.
- Pipeta Volumétrica de 5 ml.
- Micropipetas automática de 100 µl.
- Puntas de pipeta (Tips) con filtro.
- Matraz aforado (fiola) de 25 ml.
- Botellas de Solvente de 1L.
- Botellas de Solvente de 500 ml.
- Botellas de Solvente de 250 ml.
- Botellas de Solvente de 1L ámbar.
- Cronómetro

Materiales Médicos Fungibles.

- Plumón marcador indeleble, resistente al agua.
- Plumón indeleble resistente a -20°C.
- Papel absorbente.

Medicamentos.

- Etanol Absoluto.
- Agua HPLC.
- Metanol HPLC.
- Etanol al 70%.
- Isopropanol.
- Acetonitrilo.
- Parafilm.
- Papel de aluminio.

VII. Consideraciones Específicas

a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento:

Sistema LC-MS/MS

1. Equipamiento y parámetros del equipo de HPLC para el análisis de los aminoácidos, 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. 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) con un prefiltro PEEK.

**GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS
Y ACILCARNITINAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM PARA TAMIZAJE NEONATAL AMPLIADO.**

Ajustes del equipo:

- Auto-inyector: 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:

- El gradiente deberá ajustarse, eventualmente, debido a los diferentes volúmenes muertos de los sistemas de HPLC. Por eso, el gradiente indicado debe tomarse como base para la optimización.
- Hay que situar la ventana temporal de medición del sistema MS en tándem durante el intervalo temporal en el que las intensidades de señal alcanzan el nivel máximo (aprox. 0,25 a 1,25 min).

Tiempo (min)	0	0,24	0,25	1,24	1,25	1,50	1,51
Flujo (µl/min)	200	200	20	20	600	200	200

Si el sistema de HPLC no puede mantener un flujo constante de 20 µl/min, se puede trabajar entonces de forma isocrática a 100-150 µl/min. Sin embargo, hay que tener en cuenta que con el método isocrático la sensibilidad será menor.

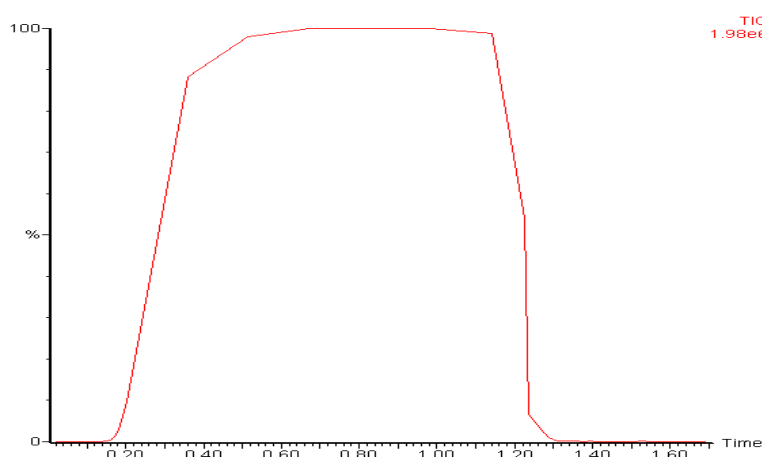


Figura 1: Cromatograma con una gradiente de flujo

2. Medición MS/MS

2.1. Principio del proceso de medición:

Las moléculas son analizadas en el espectrómetro de masas mediante la relación masa-carga (m/z). Para ello hay que ionizar primero las moléculas. El uso de la ionización por electrospray en la técnica LC-MS ha demostrado ser un método especialmente suave para generar iones moleculares. La espectrometría de masas en tándem utiliza dos espectrómetros de masas conectados consecutivamente. En el primero (MS 1), los iones son separados según la relación masa-carga. A continuación, los iones llegan a una celda de colisión en la que son fragmentados mediante la colisión común gas inerte (argón o nitrógeno). En el segundo espectrómetro (MS 2) se vuelven a analizar los fragmentos caracterizados según su relación masa-carga. En la técnica MS/MS se contemplan varios tipos de medición según el patrón de fragmentación como el neutral loss scan, parent ion scan y MRM, este último se utiliza en este manual de procedimiento.

Multiple Reaction Monitoring (MRM):

En el modo MRM ambos espectrómetros están ajustados estáticamente a una masa determinada. MS 1 selecciona únicamente el ión molecular, mientras que los iones de diferente masa son suprimidos. El ión molecular se fragmenta a continuación en la celda de colisión y el fragmento característico es detectado por MS 2. El modo MRM garantiza la mayor selectividad, junto con una alta sensibilidad. Por ello recomendamos cuantificarlos aminoácidos y también las acilcarnitinas en modo MRM.

3. Funcionamiento

3.1. Antes de iniciar la serie de análisis

- Antes de iniciar una secuencia de análisis, las bombas de vacío del sistema
- LC- MS/MS deben llevar 8 horas en funcionamiento.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS
Y ACILCARNITINAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM PARA TAMIZAJE NEONATAL AMPLIADO.

- 2. A continuación, hay que lavar el equipo con unos 10 ml de fase móvil, con una velocidad de flujo de 200 μ l/min.
- Después, inyectar varias veces los dos controles procesados hasta que dos cromatogramas por cada uno de los controles sean casi idénticos en sus valores de concentración e intensidades de señal.
- Posterior a lo descrito, se puede iniciar los análisis por el personal capacitado.

3.2. Pausas en el funcionamiento

Durante las pausas en el funcionamiento se puede apagar la bomba de HPLC, dejando que la fase móvil permanezca en el sistema de HPLC. Es imposible que se produzca una cristalización salina en las guarniciones del émbolo de la bomba de HPLC. Las bombas de vacío del sistema LC-MS/MS deberían estar constantemente en funcionamiento. Para proteger la fuente de ionización y el multiplicador, el sistema MS/MS debe conectarse en modo Standby.

4. Transferencia de masas de los analitos y del estándar interno

Las siguientes tablas contienen las transiciones recomendadas y modos de medición de los analitos y de los estándares internos marcados isotópicamente.

Fecha: Marzo 2019	Código: GP-010/INSN-SB/USDXT-V.01	Página 9 de 30
-------------------	-----------------------------------	----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS
Y ACILCARNITINAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM PARA TAMIZAJE NEONATAL AMPLIADO.

Aminoácidos:

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
Fenilalanina -D5	MRM	171 > 125
Prolina	MRM	116 > 70
Prolina-D7	MRM	123 > 77
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 situación exacta del máximo de la señal varía ligeramente en cada sistema MS, y debe determinarse con exactitud dentro del marco de la afinación de la máquina (por lo menos en un decimal). Para ello se puede emplear el Tuning Mix , que contiene todos los analitos y estándares internos.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS
Y ACILCARNITINAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM PARA TAMIZAJE NEONATAL AMPLIADO.**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
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 correspondiente estándar interno marcado isotópicamente. Además, este kit de reactivos permite el análisis de numerosas acilcarnitinas, interesante 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. Cuantificar estos marcadores de enfermedad con los estándares deuterados de la misma longitud de cadena, cabe señalar que el kit de reactivos está validado para aquellos analitos que van acompañados por un estándar interno deuterado idéntico (ver tabla).

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS
Y ACILCARNITINAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM PARA TAMIZAJE NEONATAL AMPLIADO.

La tabla siguiente contiene más acilcarnitinas, sus transiciones y los estándares internos marcados isotópicamente recomendados. Estos datos son una recomendación basada en la práctica diaria de varios laboratorios de tamizaje ⁽³⁾. El kit de reactivos no ha sido validado para estos analitos.

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
C10:1-Carnitina	314 > 85	C10-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
C16:1-Carnitina	398 > 85	C16-Carnitina-D3
C16:1OH-Carnitina	414 > 85	C16-Carnitina-D3
C16OH-Carnitina	416 > 85	C16-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

5. Preparación de la muestra**5.1. Obtención y conservación de muestras de pacientes**

El momento de extracción de sangre para el tamizaje neonatal ampliado debe situarse entre las 48 y 72 horas de vida.

La sangre total se deja gotear y secar sobre una tarjeta de papel filtrante aprobado por la FDA o similar (por ejemplo tipo 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.

Después de la extracción la sangre debe secar por al menos 4 horas a temperatura ambiente sobre una superficie horizontal, seca y no absorbente.

Las tarjetas de papel de filtro secas se envían a laboratorio a las siguientes 24 horas. Las muestras de sangre seca se conservan estables a temperatura ambiente (+20 a +25 °C) o refrigeradas (+2 a +8 °C) hasta 21 días. En caso de almacenamiento más prolongado, las muestras deben conservarse congeladas y protegidas frente a la humedad a temperaturas de menos de -18 °C. Evite temperaturas de más de 37 °C debido que puede provocar la reducción de la concentración de algunos aminoácidos.

5.2. Reconstitución del estándar interno

El estándar interno sirve como calibrador de cada muestra individual. Es trazable a patrones de sustancias puras marcadas isotópicamente obtenidas con 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.

1. El estándar interno liofilizado se reconstituye con exactamente 25 ml de Extracción Buffer.
2. Para ello es necesario abrir un frasco de estándar interno y disolver el contenido en 5 ml de Extracción Buffer.
3. Dejar reposar unos 5 min. a temperatura ambiente, agitando ocasionalmente el frasco. Introducir el contenido de la botella en un matraz aforado de 25 ml.
4. Enjuagar 2 veces más el frasco de estándar interno con 5 ml de Extracción Buffer y verter en el matraz.

5. Llenar el matraz con Extracción Buffer hasta los 25 ml y mezclar. ¡Evitar la luz del sol directa!
6. Las concentraciones dependen del lote de fabricación y deben consultarse en la hoja de información del estándar interno correspondiente.

Estabilidad del estándar interno reconstituido: es estable hasta 3 semanas, si se protege de la luz, se cierra herméticamente y se almacena en frío (+2 hasta +8 °C).

5.3. Manipulación de los controles de sangre seca

1. Los controles de Dried Blood Spot Level I y Level II, son sometidos a los mismos procesos de preparación de muestras que las muestras de los pacientes. Con ellos se controla la exactitud y la precisión del sistema.
2. Una vez abierto el embalaje del material de control, verificar el indicador de humedad. Se debe controlar el nivel de humedad cada vez que se abre el embalaje. Si el indicador de humedad cambia su color de azul a rosado al 50 % de nivel, entonces hay que regenerar el desecante calentándolo durante 4 horas a 60 °C.
3. El embalaje debe abrirse cuando los controles congelados se hayan calentado a temperatura ambiente, para protegerlo del agua de condensación. Hay que introducir el material de control sobrante en el embalaje al terminar de usarlo, cerrar la cremallera y almacenarlo a temperaturas de menos de -18 °C.
4. El embalaje está provisto de un indicador de temperatura, la coloración irreversible del indicador de blanco al negro indica que se ha alcanzado la temperatura correspondiente.
5. Evitar temperaturas de más de 37 °C. Esto puede provocar la reducción de la concentración de algunos analitos (aminoácidos). Evitar la luz del sol directa sobre los controles.

Las concentraciones dependen del lote de fabricación, por tanto debe consultarse en la hoja de información del control correspondiente.

5.4. Proceso de preparación de muestras

5.4.1. Preparación de muestras sin placa filtrante

- **Punzonado de la muestra:**

Recortar el punto de sangre seca de la tarjeta con un diámetro de 3 mm sobre una placa de pocillos.

- **Extracción:**

Añadir 100 µl del estándar interno reconstituido. Cubrir la placa con una lámina protectora y agitar durante 20 min a temperatura ambiente a 600 rpm.

- **Trasvase:**

Retirar la lámina de la placa y pasar la fracción sobrenadante a una nueva placa. Sellar la placa con una lámina adhesiva perforable.

- **Inyección:**

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

- **Control de calidad:**

En cada serie de análisis se deberían realizar controles para documentar la precisión y la exactitud.

5.4.2. Estabilidad de las muestras preparadas

Los eluatos/muestras procesadas se conservan hasta 10 días a temperatura ambiente (+20 °C hasta +25°C) o en el refrigeración (+2 hasta +8 °C) (en recipientes herméticos y protegidos de la luz).

6. 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. Proceder a añadir 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, por tanto se consultará de la hoja de información del lote que este en uso.

Para poder cuantificar la muestra se requiere el volumen de sangre empleada. El volumen de sangre que hay en un disco de papel

Fecha: Marzo 2019	Código: GP-010/INSN-SB/USDXT-V.01	Página 15 de 30
-------------------	-----------------------------------	-----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS
Y ACILCARNITINAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM PARA TAMIZAJE NEONATAL AMPLIADO.

filtrante depende del diámetro punzonado, del hematocrito de la muestra y del material del papel filtrante. El diámetro que utilizamos es de 3 mm de punzonado, un hematocrito de 0,35 a 0,45 y un papel filtrante de la marca Whatman 903, el volumen medio de sangre es de 3,1 μ l. Dado que el volumen varía en cada muestra, este tamizaje es un proceso de análisis semicuantitativo. Por ello, para confirmar resultados de tamizaje positivos se debe realizar pruebas de laboratorio adicionales.

Antes de analizar muestras de pacientes hay que realizar ciclos de prueba. Para ello, se inyecta varias veces una alícuota de los controles procesados, hasta que dos espectros de masas consecutivos sean casi idénticos en sus valores de concentración e intensidades de señal. 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 del estándar interno:

Aminoácidos:

Internal Standard	Concentración (μ mol/l)	Concentración referida a la muestra para 100 μ l IS/3,1 μ l de sangre (μ mol/l)
C0-Carnitina-D9	ver hoja informativa	ver hoja informativa
C2-Carnitina-D3	- " -	- " -
C3-Carnitina-D3	- " -	- " -
C4-Carnitina-D3	- " -	- " -
C5-Carnitina-D9	- " -	- " -
C5DC-Carnitina-D6	- " -	- " -
C6-Carnitina-D3	- " -	- " -
C8-Carnitina-D3	- " -	- " -
C10-Carnitina-D3	- " -	- " -
C12-Carnitina-D3	- " -	- " -
C14-Carnitina-D3	- " -	- " -
C16-Carnitina-D3	- " -	- " -
C18-Carnitina-D3	- " -	- " -

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS
Y ACILCARNITINAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM PARA TAMIZAJE NEONATAL AMPLIADO.

Acilcarnitinas y carnitina libre:

Internal Standard	Concentración ($\mu\text{mol/l}$)	Concentración referida a la muestra para 100 μl IS/3,1 μl de sangre ($\mu\text{mol/l}$)
C0-Carnitina-D9	ver hoja informativa	ver hoja informativa
C2-Carnitina-D3	- " -	- " -
C3-Carnitina-D3	- " -	- " -
C4-Carnitina-D3	- " -	- " -
C5-Carnitina-D9	- " -	- " -
C5DC-Carnitina-D6	- " -	- " -
C6-Carnitina-D3	- " -	- " -
C8-Carnitina-D3	- " -	- " -
C10-Carnitina-D3	- " -	- " -
C12-Carnitina-D3	- " -	- " -
C14-Carnitina-D3	- " -	- " -
C16-Carnitina-D3	- " -	- " -
C18-Carnitina-D3	- " -	- " -

El cálculo de las concentraciones de los analitos en las muestras se calcula de acuerdo al siguiente principio:

- Intensidad de señal de la sustancia A en el espectro de la muestra = A_{muestra}
- Intensidad de señal del estándar interno en el espectro de la muestra = E_{muestra}
- Concentración C del estándar interno referida a la muestra = $C_{\text{estándar}}$

La concentración del C analito, en la muestra se calcula de la siguiente forma:

$$\text{Canalito, muestra } (\mu\text{mol/l}) = \frac{A_{\text{muestra}}}{E_{\text{muestra}}} \times C_{\text{estándar}}$$

Cada laboratorio de tamizaje debe establecer sus propios valores de corte en un estudio piloto.

En el anexo 2 se indica los factores de conversión entre concentraciones en masa y concentraciones molares, y a la inversa.

7. Interferencias conocidas

- a. La isoleucina interfiere con la leucina. La concentración medida en la muestra es una suma de ambos compuestos.
- b. 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.
- c. 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 alrededor de 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.
- d. 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.
- e. 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.
- f. 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, un suplemento alimenticio para el desarrollo muscular, interfiere con la alanina y la leucina.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS
Y ACILCARNITINAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM PARA TAMIZAJE NEONATAL AMPLIADO.

- g. 4-aminoantipirina, un metabolito del analgésico Metamizol (p. ej. Novalgina®), interfiere con C2- carnitina.
- h. 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.
- i. Los aditivos en recipientes de plástico (placas, láminas) que son usados en la preparación de muestras pueden interferir considerablemente con algunas acilcarnitinas y arrojar así falsos positivos entre los resultados. Por este motivo, este kit de reactivos contiene todos los reactivos y recipientes de preparación de muestras necesarios para realizar una analítica libre de interferencias.
- j. En aquellos pacientes que reciben alimentación parenteral, en la que la tirosina es sustituida por acetiltirosina, la concentración de tirosina puede ser baja. Esto puede elevar el cociente Phe/Tyr, aparentando ser una fenilketonuria, aunque la concentración de fenilalanina esté dentro de un rango normal.
- k. En los pacientes que han recibido tratamiento antibiótico a base de ácido piválico, la formación de pivalilcarnitina, un isómero de la isovalerilcarnitina, puede provocar un aumento de la concentración de C5-carnitina. Esto puede llegar a interpretarse erróneamente como una acidemia isovalérica (IVA), aunque no haya ningún trastorno metabólico.

**GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS
Y ACILCARNITINAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM PARA TAMIZAJE NEONATAL AMPLIADO.**

8. Localización y resolución de problemas

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

9. Seguridad en el Laboratorio

El personal del área debe tener un conocimiento sobre la manipulación de productos químicos, se entiende por las propiedades del material y de los posibles peligros que emanan de él. Debe tenerse presente, que pueden producirse reacciones peligrosas inesperadas.

Fecha: Marzo 2019	Código: GP-010/INSN-SB/USDXT-V.01	Página 20 de 30
--------------------------	--	------------------------

Debe tomarse las medidas de seguridad necesarias en el manejo de productos químicos, sobre todo del material peligroso. Tener en cuenta las indicaciones en las etiquetas sobre los riesgos y los consejos de manipuleo según anexo 3.

Cuando se trate de una sustancia cuyas propiedades toxicológicas se desconozcan, la misma ha de ser manipulada con los cuidados usuales para productos químicos peligrosos.

Considerar a los controles internos de riesgo biológico debido que se producto de un pool de sangre humana, cuyos análisis han salido negativos para enfermedades infecciosas (anticuerpos de VIH 1/2, ADN de VIH, VCH y VBH (PCR), antígenos HBs, anticuerpos HBc y ensayo TPHA). Sin embargo, no es posible descartar totalmente un riesgo de infección al usar este producto. Al usar estos productos se tienen que cumplir las mismas medidas de precaución que en el manejo de muestras de pacientes potencialmente infecciosas.

El tratamiento de los residuos de la Mobile Phase, Rinsing Solution, Extraction Buffer y Tuning Mix, así como los restos de las muestras extraídas, contienen solventes orgánicos y deben ser eliminadas correctamente según establezcan el manual de residuos del INSN-SB.

b. Indicaciones

1. Indicaciones Absolutas

Detección de errores innatos del metabolismo, asociado a alteraciones cuantitativas en aminoácidos y acilcarnitinas.

2. Indicaciones Relativas

- Todos aquellos casos en los que se requiera la detección y cuantificación de distintos aminoácidos y acilcarnitinas, para detección o prevención de complicaciones en desordenes metabólicos, independientemente de la edad.
- Puede ser usado como tamizaje complementario al tamizaje básico.

c. Riesgos o Complicaciones Frecuentes:

Ninguna



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional de Salud
del Niño - San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS
Y ACILCARNITINAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM PARA TAMIZAJE NEONATAL AMPLIADO.

d. **Contraindicaciones**

Ninguna.

VIII. Recomendaciones

La toma de muestra debe realizarse al menos 24-36 horas posterior al inicio de la lactancia materna.

IX. Autores, Fecha y Lugar

Instituto Nacional de Salud del Niño - San Borja

Sub Unidad de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Fecha de Elaboración: Enero 2019

Vigencia: 02 años

Autores:

- | | |
|--------------------------------------|--------------------------|
| 1. Dra. Luzmila Rodríguez Pinto | lrodriguez@insnsb.gob.pe |
| 2. Q.F. Luz Jeannette Abanto Aguilar | jabanto@insnsb.gob.pe |

X. Bibliografía

1. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 1963; 32(3): 338-43.
2. Pàmpols T. Neonatal screening. *Turk J Pediatr* 2003; 45(2): 87-94.
3. Manual de instrucciones para análisis por LC-MS/MS CHROMSYSTEMS.
4. Derbis H. Tamiz de los errores innatos del metabolismo por espectrometría de masas en tándem. *Rev Panam Salud Publica*.2010;24(4):309-318.
5. Kassenärztliche Bundesvereinigung (2005). Beschluss über eine Änderung der Kinder- Richtlinie zur Einführung des erweiterten Neugeborenen-Screenings. *Dtsch Ärztebl* 102(16): A1158-63.
6. Roscher AA, Olgemöller B. (2004) Newborn screening for inborn errors of metabolism with tándem spectrometry in Bavaria, Germany. *LaboratoriumsMedizin* 28(6): 521-524.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS
Y ACILCARNITINAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM PARA TAMIZAJE NEONATAL AMPLIADO.

7. Cavedon CT, Bourdoux P, Mertens K, Thi HVV, Herremans N, de Laet C, Goyens P. (2005) Agerelated variations in acylcarnitine and free carnitine concentrations measured by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 51(4): 745–52.
8. Chace DH, Adam BW, Smith SJ, Alexander JR, Hillman SL, Hannon WH. (1999) Validation of accuracy-based amino acid reference materials in dried-blood spots by tandem mass spectrometry for newborn screening assays. *Clin Chem* 45(8): 1269–77.
9. Zytkevich TH, Fitzgerald EF, Marsden D, Larson CA, Shih VE, Johnson DM, Strauss AW, Comeau AM, Eaton RB, Grady GF. (2001) Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: A two-year summary from the New England Newborn Screening Program. *Clin Chem* 47(11): 1945–55.
10. Schulze A, Lindner M, Kohlmüller D, Olgemöller K, Mayatepek E, Hoffmann GF. (2003) Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications. *Pediatrics* 111(6): 1399–1406.
11. Ceglarek U, Stopsack M, Stach B, Müller P, Näke A, Hübner A, Brügel M, Bührdel P, Kies W, Gahr M, Thiery J. (2003) Ergebnisse des sächsischen Neugeborenen Screenings 2001. *Ärztebl Sachsen* 1: 12–15.
12. Sander J, N. Janzen N. (2000) Fettsäureoxidationsstörungen. Frühdiagnose durch Tandem-Massenspektrometrie. *Pädiatrie hautnah* 12(4):161–7.
13. Gempel K, Bauer MF, Gerbitz KD. (1999) Mitochondriale Erkrankungen. *Dtsch Ärztebl* 96(47): A3035–42. 10. Knerr I, Nennstiel-Ratzel U, Röschinger W, Maier EM, Baumkötter J, von Kries R. (2005) Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel: eine klinisch bedeutsame Stoffwechselstörung. *Dtsch Ärztebl* 102(38): A2565–9



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional de Salud
del Niño - San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS
Y ACILCARNITINAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM PARA TAMIZAJE NEONATAL AMPLIADO.

14. Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. (2003) Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin Chem* 49(11): 1797–817.



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional de Salud
del Niño - San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS
Y ACILCARNITINAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM PARA TAMIZAJE NEONATAL AMPLIADO.

XI. Anexos

ANEXO 1:

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA TAMIZAJE NEONATAL AMPLIADO

(DS.N°027-2015-SA. Reglamento de la Ley N°29414. Ley que establece los Derechos de las Personas Usuarias de los Servicios de Salud. Ley General de Salud N° 26842 .RD N°/20...../INSN-SB)

El propósito de esta ficha de consentimiento es proveer a usted la explicación de esta prueba de laboratorio, y autorice la realización de la misma a su menor hijo.

La prueba de tamizaje neonatal ampliado por espectrometría de masa en tándem permitirá tamizar enfermedades llamadas Errores Innatos del Metabolismo (EIM) o enfermedades metabólicas hereditarias, y son patologías bioquímicas que, en la mayoría de los casos, afectan al metabolismo de los aminoácidos, de los ácidos grasos o de los ácidos orgánicos. Quiere decir que podremos detectar a bebés con problemas en el metabolismo de los alimentos. Estas enfermedades no muestran síntomas al nacer, por tanto lo ideal es diagnosticarlas a temprana edad, antes que avance y ocurra daño cerebral entre otros. El tamizaje neonatal ampliado tiene por objetivo la detección precoz de dichos errores, radicando su importancia en reducir la morbi-mortalidad y prevenir daños irreversibles.

Si usted accede a la autorización para la realización de la prueba a su menor hijo, se le solicitará el permiso para que se realice la toma de muestra de sangre de talón de su menor hijo en mínimas cantidades (4 gotas aprox.). Este tipo de muestra es considerada de riesgo menor al mínimo es decir un riesgo similar al de las tomas de muestra de sangre rutinarias en recién nacidos. Estas muestras son procesadas en el laboratorio de espectrometría de masas –Servicio de Patología Clínica del INSN-SB.

Las pruebas de tamizaje no son pruebas diagnósticas definitivas; en caso de obtener un resultado positivo, los niños deben someterse a segundas determinaciones para confirmar o descartar la enfermedad. Es así que puede requerirse una nueva toma; pudiendo solicitarse, además, una muestra de orina.

La autorización para esta prueba es voluntaria, la información que se recoja será confidencial y se usará para fines del resultado de la prueba y realización de estudios complementarios de requerir y en caso haya disponibilidad. Cabe señalar que la muestra una vez analizada será almacenada por el periodo de un año y posteriormente será descartada o utilizada para fines de investigación sin fines de lucro.

Cualquier consulta podrá acercarse al laboratorio del Servicio de Patología Clínica del INSN-SB.



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional de Salud
del Niño - San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS
Y ACILCARNITINAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM PARA TAMIZAJE NEONATAL AMPLIADO.

DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

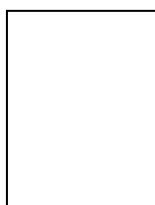
Yo _____, identificado (a) con DNI (), C.E.
(), Pasaporte () N° _____, en calidad de Madre (), Padre (), Apoderado/Tutor Legal ()
del (la) paciente _____, con
_____ de edad, identificado con DNI N° _____, Historia Clínica N° _____
con el
Diagnóstico _____
_____.

Declaro :

Que el Médico _____ con CMP N° _____, y RNE N° _____,
me ha explicado que es conveniente/necesario, debido al diagnóstico de mi familiar, la realización
de la prueba de tamizaje neonatal en sangre seca sobre los cuales he sido informado(a). Así mismo
he comprendido los beneficios de la prueba de tamizaje, este tipo de muestras es considerada de
riesgo menor al mínimo similar al de las tomas de muestras rutinarias, y entiendo que la custodia
de la muestra por es por 1 año, después del cual se descartará o será utilizado en fines de
investigación.

Por lo tanto con la información completa, oportuna y sin presión; yo, voluntaria y libremente:

**Doy mi Consentimiento para la realización de la prueba de Tamizaje neonatal ampliado por
MS/MS**



San Borja, dedel 20.....

Huella Digital

Firma del Representante Legal
Nombre _____
N° _____
DNI N° _____
N° _____

Firma del Médico Responsable
CMP _____
RNE _____



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional de Salud
del Niño - San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS
Y ACILCARNITINAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM PARA TAMIZAJE NEONATAL AMPLIADO.

REVOCATORIA DEL CONSENTIMIENTO

Yo _____, identificado (a) con DNI (), C.E. (), Pasaporte () N° _____, en calidad de Madre (), Padre (), Apoderado/Tutor Legal () del (la) paciente _____, con _____ de edad, identificado con DNI N° _____, Historia Clínica N° _____, de forma libre y consciente he decidido **Revocar el Consentimiento** firmado en fecha _____ para la realización de la prueba de Tamizaje neonatal ampliado por MS/MS y asumo las consecuencias que de ello puedan derivarse para la salud de mi representado.

San Borja, dedel 20.....



Huella Digital

Firma del Representante Legal

Nombre _____

N° _____

DNI N° _____

N° _____

Firma del Médico Responsable

CMP

RNE

**GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS
Y ACILCARNITINAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM PARA TAMIZAJE NEONATAL AMPLIADO.**

Anexo 2: Factores de conversión

La siguiente tabla contiene los factores de conversión entre concentraciones en masa y concentraciones molares, y a la inversa.

Aminoácidos:

Analito	µmol/l en mg/l	mg/l en µmol/l
Alanina	x 0,0891	x 11,223
Arginina	x 0,1742	x 5,7405
Ácido aspártico	x 0,1331	x 7,5126
Citrulina	x 0,1752	x 5,7081
Ácido glutámico	x 0,1471	x 6,7967
Glicina	x 0,0751	x 13,321
Leucina	x 0,1312	x 7,6237
Metionina	x 0,1492	x 6,7020
Ornitina	x 0,1322	x 7,5666
Fenilalanina	x 0,1652	x 6,0536
Prolina	x 0,1151	x 8,6858
Tirosina	x 0,1812	x 5,5191
Valina	x 0,1172	x 8,5361

Acilcarnitinas y carnitina libre:



Analito	µmol/l en mg/l	mg/l en µmol/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

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS
Y ACILCARNITINAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM PARA TAMIZAJE NEONATAL AMPLIADO.

Anexo 3 : Sustancias peligrosas.

Símbolos de peligro	Frases R y S
Mobile Phase (n° de pedido 57001, 57002)	
 Xn (Nocivo)	R11-20/21/22-36 Fácilmente inflamable. Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel. Irrita los ojos.
 F (Fácilmente inflamable)	S16-36/37 Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas - No fumar. Úsen se indumentaria y guantes de protección adecuados.
Rinsing Solution (n° de pedido 57007)	
 Xn (Nocivo)	R11-20/21/22-36 Fácilmente inflamable. Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel. Irrita los ojos.
 F (Fácilmente inflamable)	S16-36/37 Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas - No fumar. Usar indumentaria y guantes de protección adecuados.
Extraction Buffer (n° de pedido 57008)	
 T (Tóxico)	R11-23/24/25-39/23/24/25 Fácilmente inflamable. Tóxico por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel. Tóxico: peligro de efectos irreversibles muy graves por inhalación, contacto con la piel e ingestión.
 F (Fácilmente inflamable)	S7-16-36/37-45 Mantener el recipiente bien cerrado. Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas - No fumar. Usar indumentaria y guantes de protección adecuados. En caso de accidente o malestar, acudir inmediatamente al médico (si es posible, mostrar la etiqueta).

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS
Y ACILCARNITINAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM PARA TAMIZAJE NEONATAL AMPLIADO.

Símbolos de peligro	Frases R y S
Tuning Mix (n° de pedido 57099)	
 <p>Xn (Nocivo)</p>	<p>R11-20/21/22-36 Fácilmente inflamable. Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel. Irrita los ojos.</p>
 <p>F (Fácilmente inflamable)</p>	<p>S16-36/37 Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas - No fumar. Usar indumentaria y guantes de protección adecuados.</p>
<p>Estos elementos han sido clasificados como no peligrosos acorde a la legislación de la Unión Europea:</p> <p>Internal Standard (n° de pedido 57004) Masscheck® Dried Blood Spot Controls (n° de pedido 0191, 0192, 0193)</p>	