República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
2021 - Año de Homenaje al Premio Nobel de Medicina Dr. César Milstein

Disposición

Número: DI-2021-8581-APN-ANMAT#MS

CIUDAD DE BUENOS AIRES
Miércoles 17 de Noviembre de 2021

Referencia: EX-2020-87839131-APN-DGA#ANMAT

VISTO el expediente Nº EX-2020-87839131-APN-DGA#ANMAT del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por los presentes actuados la firma JENCK S.A. solicita autorización para la venta a laboratorios de análisis clínicos de los Productos Médicos para diagnóstico de uso “in vitro” denominados 1) 1000/B VMA, HVA and 5-HIAA in urine; 2)

1011 Mobile Phase; 3) 1003/B Calibration Standard; 4) 1009 Urine Calibration Standard; 5) 1004/B Internal Standard; 6) 1005 Wash Buffer I; 7) 1006 Wash Buffer II; 8) 1077 Elution Buffer; 9) 1013 Finisher; 10) 1008 Sample Clean Up Columns.

Que en el mencionado expediente consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico in vitro que establece que los productos reúnen las condiciones de aptitud requeridas para su autorización.

Que el Instituto Nacional de Productos Médicos ha tomado la intervención de su competencia.

Que se ha dado cumplimiento a los términos que establece la Ley Nº 16.463, Resolución Ministerial Nº 145/98 y Disposición ANMAT Nº 2674/99.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por el Decreto Nº 1490/92 y sus modificatorios.

Por ello;

EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE

MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA

D I S P O N E:

ARTÍCULO 1º.- Autorizase la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM) de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) de los productos médicos para diagnóstico de uso in vitro denominados1) 1000/B VMA, HVA and 5-HIAA in urine; 2) 1011 Mobile Phase; 3) 1003/B Calibration Standard; 4) 1009 Urine Calibration Standard; 5) 1004/B Internal Standard; 6) 1005 Wash Buffer I; 7) 1006 Wash Buffer II; 8) 1077 Elution Buffer; 9) 1013 Finisher; 10) 1008 Sample Clean Up Columns, con los Datos Característicos que figuran al pie de la presente, de acuerdo con lo solicitado por la firma JENCK S.A.

ARTICULO 2º.- Autorícense los textos de los proyectos de rótulos y Manual de Instrucciones que obran en el documento Nº IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT.

ARTÍCULO 3º.- En los rótulos e instrucciones de uso autorizados deberá figurar la leyenda “Autorizado por la ANMAT PM Nº 2188-1”, con exclusión de toda otra leyenda no contemplada en la normativa vigente.

ARTICULO 4°.- Extiéndase el Certificado de Autorización e Inscripción en el RPPTM con los datos característicos mencionados en esta disposición.

ARTÍCULO 5º.- Regístrese. Inscríbase en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica los nuevos productos. Por el Departamento de Mesa de Entrada, notifíquese al interesado, haciéndole entrega de la presente Disposición, conjuntamente con rótulos e instrucciones de uso autorizados y el Certificado mencionado en el artículo 4°. Gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a los fines de confeccionar el legajo correspondiente. Cumplido, archívese.-

DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERISTICOS

EMPRESA: JENCK S.A.

NOMBRE COMERCIAL: 1) 1000/B VMA, HVA and 5-HIAA in urine; 2)

1011 Mobile Phase; 3) 1003/B Calibration Standard; 4) 1009 Urine Calibration Standard; 5) 1004/B Internal Standard; 6) 1005 Wash Buffer I; 7) 1006 Wash Buffer II; 8) 1077 Elution Buffer; 9) 1013 Finisher; 10) 1008 Sample Clean Up Columns.

INDICACIÓN DE USO: 1) VMA, HVA and 5-HIAA in urine es un kit de reactivos diseñado para el análisis de ácido vainillinmandélico, ácido homovanílico y ácido-5 hidroxiindolacético en orina por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Antes de la separación cromatográfica estos analitos se aíslan fácilmente de la matriz de la orina utilizando una columna de intercambio iónico en el proceso de preparación de muestras; 2) a 10) reactivos utilizados para el análisis de ácido vainillinmandélico, ácido homovanílico y ácido-5 hidroxiindolacético en orina por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

FORMA DE PRESENTACIÓN: 1) Envases por 100 determinaciones, conteniendo: Mobile Phase 1 x 1000 mL,

Calibration Standard 5 x 1.0 mL, Internal Standard 1 x 100 mL, Wash Buffer I 1 x 300 mL, Wash Buffer II 2 x 300 mL, Elution Buffer 1 x 200 mL, Finisher x 10 mL, Sample Clean Up Columns 2 x 50 unidades; 2) Mobile Phase 1 x 1000 mL; 3) Calibration Standard 5 x 1.0 mL; 4) Urine Calibration Standard 5 x 5.0 mL; 5) Internal Standard 1 x 100 mL; 6) Wash Buffer I 1 x 300 mL; 7) Wash Buffer II 1 x 300 mL; 8) Elution Buffer 1 x 200 mL; 9) Finisher 1 x 10 mL; y 10) Sample Clean Up Columns 1 x 50 unidades.

PERIODO DE VIDA ÚTIL Y CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 1), 3), 4) y 5): 36 (TREINTA Y SEIS) meses desde la fecha de elaboración conservado entre 2 y 8ºC; y 2), 6), 7), 8), 9) y 10): 36 (TREINTA Y SEIS) meses desde la fecha de elaboración conservado entre 18 y 30ºC.

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL FABRICANTE: Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, Am Haag 12, 82166 Gräfelfing (ALEMANIA).

Nº EX-2020-87839131-APN-DGA#ANMAT

AM

Digitally signed by GARAY Valeria Teresa
Date: 2021.11.17 16:09:28 ART
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

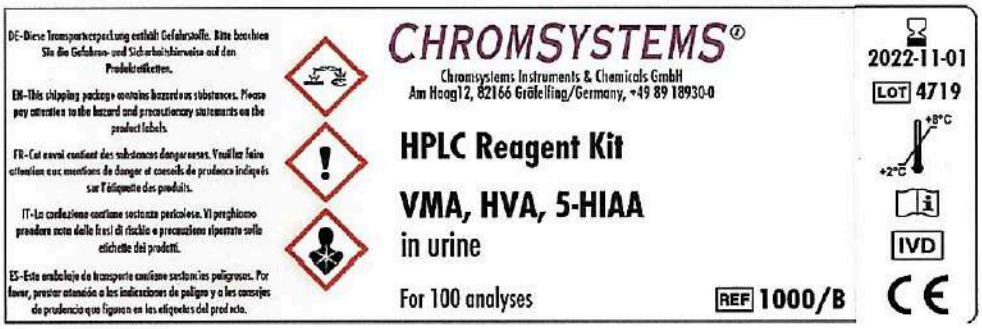
Valeria Teresa Garay
Subadministradora Nacional
Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica

Digitally signed by Gestion Documental Electronica
Date: 2021.11.17 16:09:30 -03:00

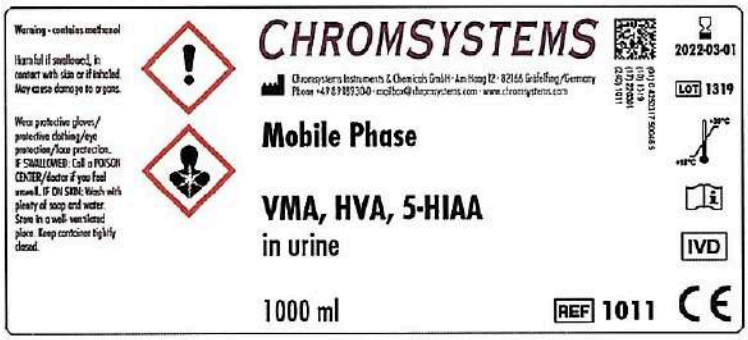
PROYECTOS DE RÓTULO EXTERNO

RÓTULO DE ORIGEN

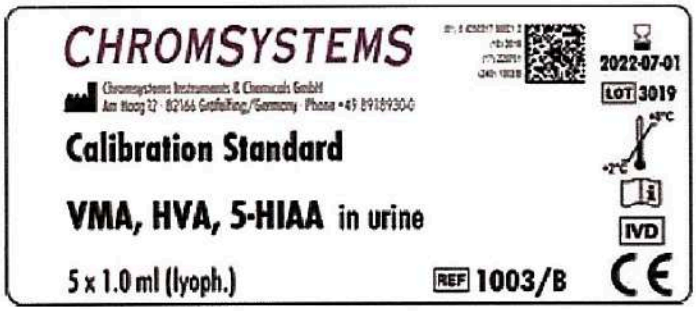
1) VMA, HVA and 5-HIAA in urine



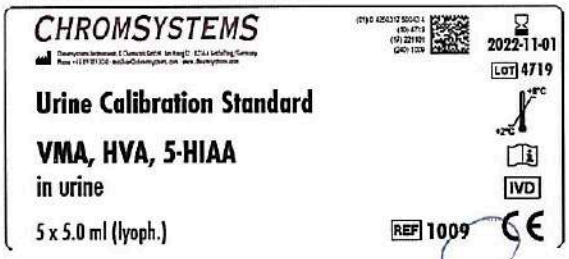
2) Mobile Phase



3) Calibration Standard



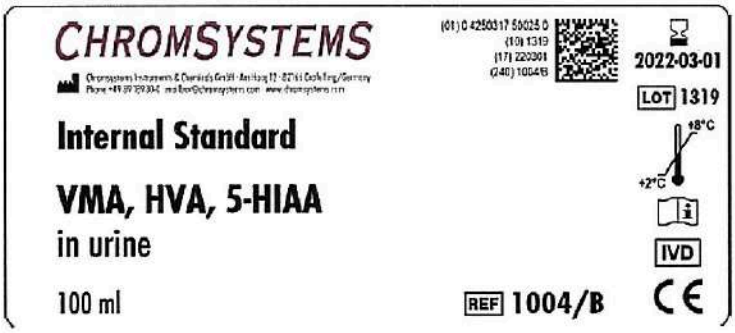
4) Urine Calibration Standard



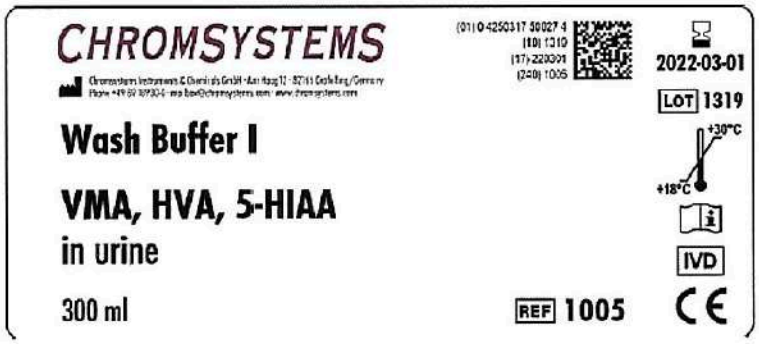
María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

JENCK S.A.
Ing. Susana Macias
Apoderada

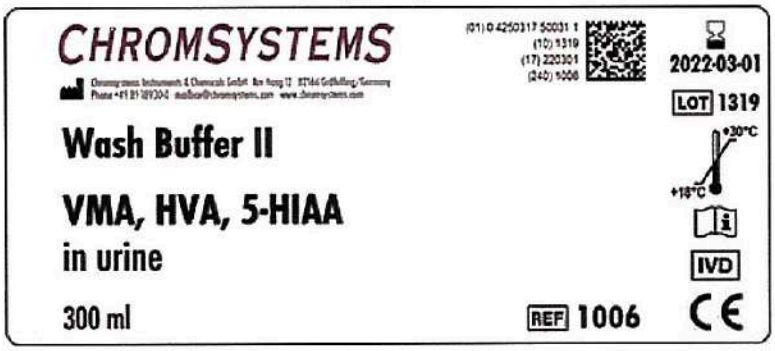
5) Internal Standard



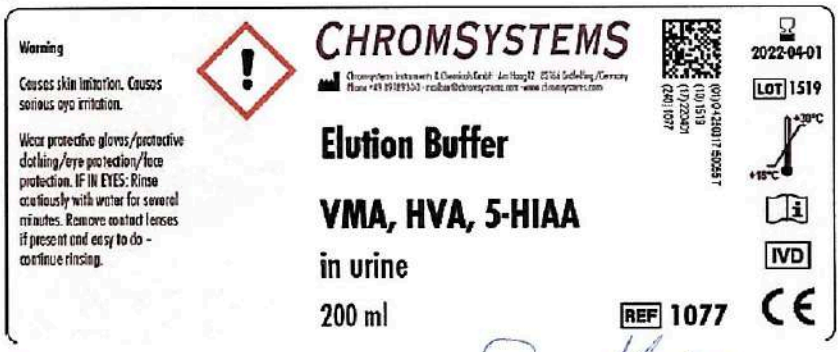
6) Wash Buffer I



7) Wash Buffer II



8) Elution Buffer



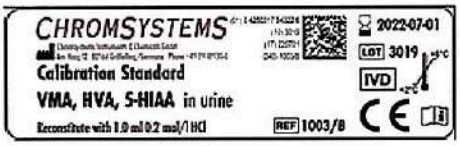
JENCK S.A.
Ing. Susana Placias
Apoderada

María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

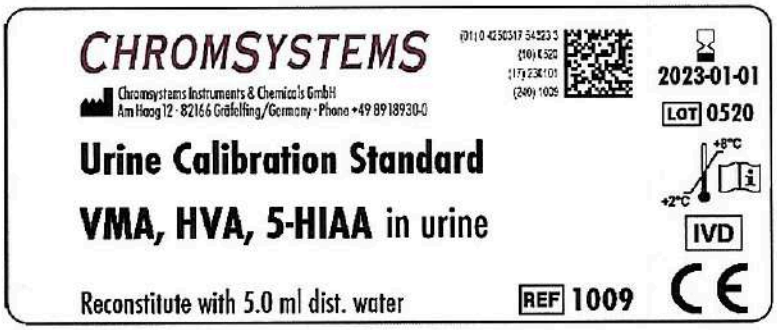
9) Finisher

10) Sample Clean Up Columns

11) Calibration Standard



12) Urine Calibration Standard



SOBRERÓTULO

JENCK S.A.
Álvarez Thomas N° 228, Ciudad Autónoma de Buenos Aires
Directora Técnica: María Cristina Vescina
Fabricante: Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, Am Haag 12, 82166 Gräfelfing, Alemania
"USO PROFESIONAL EXCLUSIVO - VENTA EXCLUSIVA A LABORATORIOS DE ANÁLISIS CLÍNICOS"
Autorizado por ANMAT- PM 2188-1

María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

JENCK S.A.
Ing. Susana Macías
Apoderada

IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT

PROYECTO DE RÓTULO INTERNO

1) VMA, HVA and 5-HIAA in urine

1. Nombre del Producto	VMA, HVA and 5-HIAA in urine
2. Número de lote o partida	LOT
3. Fecha de Vencimiento	
4. Indicación de las unidades métricas, tales como volumen, peso, actividad u otra unidad característica de cada componente del producto	1 análisis
5. Indicación de las condiciones adecuadas de almacenamiento y transporte del producto	+8°C +2°C

2) Mobile Phase

1. Nombre del Producto	Mobile Phase
2. Número de lote o partida	LOT
3. Fecha de Vencimiento	
4. Indicación de las unidades métricas, tales como volumen, peso, actividad u otra unidad característica de cada componente del producto	1000 mL
5. Indicación de las condiciones adecuadas de almacenamiento y transporte del producto	+30°C +18°C

JENCK S.A.
Ing. Susana Macias
Apoderada

María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 16.576

IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT

3) Calibration Standard

1. Nombre del Producto	Calibration Standard
2. Número de lote o partida	LOT
3. Fecha de Vencimiento	
4. Indicación de las unidades métricas, tales como volumen, peso, actividad u otra unidad característica de cada componente del producto	1.0 mL
5. Indicación de las condiciones adecuadas de almacenamiento y transporte del producto	+8°C +2°C

4) Urine Calibration Standard

1. Nombre del Producto	Urine Calibration Standard
2. Número de lote o partida	LOT
3. Fecha de Vencimiento	
4. Indicación de las unidades métricas, tales como volumen, peso, actividad u otra unidad característica de cada componente del producto	5.0 mL
5. Indicación de las condiciones adecuadas de almacenamiento y transporte del producto	+8°C +2°C

5) Internal Standard

1. Nombre del Producto	Internal Standard
2. Número de lote o partida	LOT
3. Fecha de Vencimiento	
4. Indicación de las unidades métricas, tales como volumen, peso, actividad u otra unidad característica de cada componente del producto	100 mL

JENCK S.A.
Ing. Susana Macías
Apoderada

María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.576

IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT

5. Indicación de las condiciones adecuadas de almacenamiento y transporte del producto	+8°C +2°C

6) Wash Buffer I

1. Nombre del Producto	Wash Buffer I
2. Número de lote o partida	LOT
3. Fecha de Vencimiento	
4. Indicación de las unidades métricas, tales como volumen, peso, actividad u otra unidad característica de cada componente del producto	300 mL
5. Indicación de las condiciones adecuadas de almacenamiento y transporte del producto	+30°C +18°C

7) Wash Buffer II

1. Nombre del Producto	Wash Buffer II
2. Número de lote o partida	LOT
3. Fecha de Vencimiento	
4. Indicación de las unidades métricas, tales como volumen, peso, actividad u otra unidad característica de cada componente del producto	300 mL
5. Indicación de las condiciones adecuadas de almacenamiento y transporte del producto	+30°C +18°C

8) Elution Buffer

1. Nombre del Producto	Elution Buffer
2. Número de lote o partida	LOT
3. Fecha de Vencimiento	
4. Indicación de las unidades métricas, tales como volumen, peso, actividad u	200 mL

María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.570

JENCK S.A.
Ing. Susana Macias
Apoderada

otra unidad característica de cada componente del producto	
5. Indicación de las condiciones adecuadas de almacenamiento y transporte del producto	+30°C +18°C

9) Finisher

1. Nombre del Producto	Finisher
2. Número de lote o partida	LOT
3. Fecha de Vencimiento	
4. Indicación de las unidades métricas, tales como volumen, peso, actividad u otra unidad característica de cada componente del producto	10 mL
5. Indicación de las condiciones adecuadas de almacenamiento y transporte del producto	+30°C +18°C

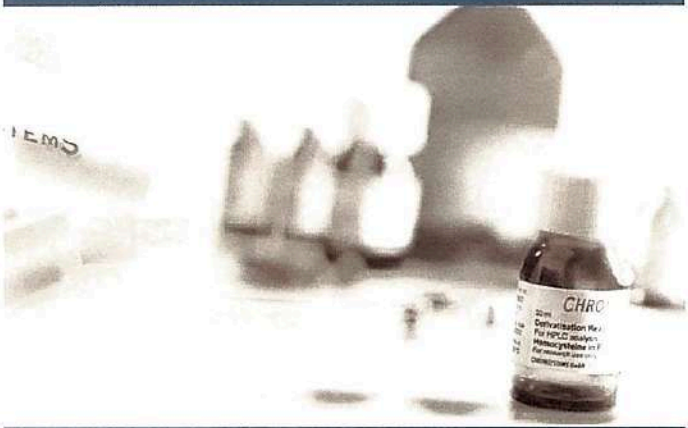
10) Sample Clean Up Columns

1. Nombre del Producto	Sample Clean Up Columns
2. Número de lote o partida	LOT
3. Fecha de Vencimiento	
4. Indicación de las unidades métricas, tales como volumen, peso, actividad u otra unidad característica de cada componente del producto	1 unidad
5. Indicación de las condiciones adecuadas de almacenamiento y transporte del producto	+30°C +18°C

JENCK S.A.
Ing. Susana Macias
Apoderada

María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

BIOGENE AMINE
BIOGENIC AMINES
AMINES BIOGÈNES
AMMINE BIOGENE
AMINAS BIÓGENAS



CHROMSYSTEMS

DIAGNOSTICS BY HPLC & LC-MS/MS

Manual de instrucciones para el análisis por HPLC

VMA, HVA, 5-HIAA
en orina

N° de pedido 1000/B

JENCK S.A.
Ing. Susana Macías
Apoderada

CE IVD

Cristina Vesci
Farmacéutica
M.N. 10.370

IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH está certificada de acuerdo con las normas ISO 9001 e 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.

© This document is protected by copyright. All rights reserved.

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
Am Haag 12
82166 Gräfelfing
Alemania

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

IF-2024-31747599-APN-DGA#ANMAT

Ing. Susana Macias
Apoderada

María Cristina Vescini
Farmacéutica
M.N. 10.370

Índice.....Página

1 Información sobre el pedido 4

2 Introducción 6
2.1 .....Información general 6
2.2 .....Uso previsto 7
2.3 .....Principio del kit de reactivos 8

3 Fundamentos de la detección electroquímica 9
3.1 .....Principio 9
3.2 .....Influencia del potencial de trabajo 9
3.3 .....Optimización del potencial de trabajo 10

4 Sistema HPLC 11
4.1 .....Equipamiento y parámetros del equipo 11
4.2 .....Columna de HPLC 12
4.3 .....Mantenimiento y cuidados del sistema HPLC 12
4.3.1... Pasivar la bomba y los capilares 12
4.3.2... Activación del electrodo de trabajo 13
4.3.3... Mantenimiento del electrodo de referencia 13
4.3.4... Evitar pulsaciones de la bomba 14
4.3.5... Pausas en el funcionamiento 14

5 Separación cromatográfica 14

6 Preparación de muestras 15
6.1 .....Obtención y conservación de las muestras de los pacientes 15
6.2 .....Reconstitución del estándar de calibración acuoso 16
6.3 .....Reconstitución del estándar de calibración de orina 16
6.4 .....Reconstitución de los controles 17
6.5 .....Uso de estándares internos 18
6.5.1... Estándar interno iso-VMA 18
6.5.2... Estándar interno HICA para el análisis por HPLC de 5-HIAA 18
6.6 .....Preparación de muestras 18
6.6.1... Tamponamiento de las muestras de orina 18
6.6.2... Preparación de muestras con columnas de intercambio aniónico .. 19
6.7 .....Estabilidad de las muestras preparadas 19

7 Registro de datos y cálculo 19
7.1 .....Calibración del sistema de cálculo 19
7.2 .....Cálculo cuantitativo con estándar interno 20

8 Control de calidad 20

9 Rangos de referencia 21

10 Factores de conversión 22

11 Almacenamiento y caducidad de los reactivos 22

12 Tratamiento de los residuos 23

13 Ejemplos de cromatogramas 24

14 Limitaciones clínicas 25

IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT
IENCA S.A.
Ing. Susana Macias
Apoderada
María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

Índice ..... Página

15 Localización y resolución de problemas 26

16 Bibliografía 28

Apéndice I: Preparación automatizada de muestras con Gilson® ASPEC™ 29

Apéndice II: Observaciones sobre las sustancias peligrosas 32

Apéndice III: Cálculo manual 33

Apéndice IV: Datos de rendimiento 34

Apéndice V: Declaración de conformidad 36

Apéndice VI: Símbolos 37

IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT

JEFA DE ST
Ing. Susana Macias
Apoderada

María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

1 Información sobre el pedido

Nº de pedido	Producto	
1000/B	**Kit de reactivos por HPLC**	
	VMA, HVA, 5-HIAA en orina	
	Contenido del kit para 100 análisis:	
	Mobile Phase	1000 ml
	Calibration Standard	5 x 1,0 ml (liof.)
	Internal Standard (iso-VMA)	100 ml
	Wash Buffer I	300 ml
	Wash Buffer II	2 x 300 ml
	Elution Buffer	200 ml
	Finisher	10 ml
	Sample Clean Up Columns	2 x 50 unidades
1000/B/A1	**Kit de reactivos por HPLC**	
	Preparación de muestras con el Gilson® ASPEC™	
	VMA, HVA, 5-HIAA en orina	
	Contenido del kit para 100 análisis:	
	Mobile Phase	1000 ml
	Calibration Standard	5,0 ml (liof.)
	Internal Standard (iso-VMA)	100 ml
	Wash Buffer I	300 ml
	Wash Buffer II	450 ml
	Elution Buffer	200 ml
	Finisher	10 ml
	Sample Clean Up Columns con tapón DEC	100 unidades
1000/B/A5	**Kit de reactivos por HPLC**	
	Preparación de muestras con el Gilson® ASPEC™	
	VMA, HVA, 5-HIAA en orina	
	Contenido del kit para 500 análisis:	
	Mobile Phase	3 x 1000 ml
	Calibration Standard	3 x 5,0 ml (liof.)
	Internal Standard (iso-VMA)	2 x 250 ml
	Wash Buffer I	1000 ml
	Wash Buffer II	2 x 1000 ml
	Elution Buffer	1000 ml
	Finisher	50 ml
	Sample Clean Up Columns con tapón DEC	5 x 100 unidades
1000/B/A9	**Kit de reactivos por HPLC**	
	Preparación de muestras con el Gilson® ASPEC™	
	VMA, HVA, 5-HIAA en orina	
	Contenido del kit para 1000 análisis:	
	Mobile Phase	6 x 1000 ml
	Calibration Standard	5 x 5,0 ml (liof.)
	Internal Standard (iso-VMA)	1000 ml
	Wash Buffer I	2 x 1000 ml
	Wash Buffer II	4 x 1000 ml
	Elution Buffer	2 x 1000 ml
	Finisher	2 x 50 ml
	Sample Clean Up Columns con tapón DEC	10 x 100 unidades

IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT
JENCK S.A.
Ing. Susana Macias
Apoderada
María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

	Componentes individuales	
1011	Mobile Phase	1000 ml
1012	Mobile Phase	10 x 1000 ml
1003/B	Calibration Standard	5 x 1,0 ml (liof.)
1009	Urine Calibration Standard	5 x 5,0 ml (liof.)
1004/B	Internal Standard	100 ml
1005	Wash Buffer I	300 ml
1006	Wash Buffer II	300 ml
1077	Elution Buffer	200 ml
1013	Finisher	10 ml
1008	Sample Clean Up Columns	50 unidades
	Accesorios	
1100/B	Columna de HPLC (equilibrada, con cromatograma de prueba)	1 unidad
15009	Prefiltro con revestimiento de PEEK, 5 µm	5 unidades
15010	Carcasa de PEEK para el prefiltro	1 unidad
17001	Soporte para cartuchos de precolumna 4/10	1 unidad
17002	Cartucho de precolumna 4/10	1 unidad
	Accesorios especiales	
51303/B	Internal Standard (10 mg HICA/l) (para aumentar la precisión del análisisdel 5-HIAA)	5 ml
1099	Potential Optimisation Mix	5 x 0,5 ml (liof.)
	Accesorios para para la preparación de muestras con el Gilson® ASPEC™	
1009/T	Urine Calibration Standard	5,0 ml (liof.)
1044/B/A1	Internal Standard	100 ml
1044/B/A5	Internal Standard	250 ml
1044/B/A9	Internal Standard	1000 ml
1005/A5	Wash Buffer I	1000 ml
1006/A	Wash Buffer II	450 ml
1006/A5	Wash Buffer II	1000ml
1008/A	Sample Clean Up Columns con tapón DEC	100 unidades
1013/A5	Finisher	50 ml
1077/A5	Elution Buffer	1000 ml
	Estándar de calibración y controles de Chromsystems para VMA, HVA, 5-HIAA en orina	
0040	Endocrine Urine Control, Normal Range	10 x 8,0 ml (liof.)
0050	Endocrine Urine Control, Pathological Range	10 x 8,0 ml (liof.)

IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT
Ing. Susana Macias
Apoderada
María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

2 Introducción

2.1 Información general

El **ácido vanilmandélico** (VMA) y el **ácido homovanílico** (HVA) son productos de la degradación de las catecolaminas adrenalina (sin. epinefrina), noradrenalina (sin. norepinefrina) y dopamina, y el **ácido 5-hidroxiindolacético** (5-HIAA), del neurotransmisor serotonina.

Las catecolaminas adrenalina (sin. epinefrina), noradrenalina (sin. norepinefrina) y dopamina, así como el neurotransmisor serotonina pertenecen a las aminas biógenas, que se forman en el organismo mediante la descarboxilación enzimática de los aminoácidos. Como mensajeras, desempeñan un papel esencial en la transmisión de impulsos del sistema nervioso. Cada una de las moléculas interactúa con receptores membranales, desencadenando reacciones complejas que afectan principalmente al sistema circulatorio. Además, la serotonina regula la función del sistema gastrointestinal e incide en el estado anímico debido a su efecto en el sistema nervioso central.

Metabolismo
A partir del aminoácido L-tirosina se forma la dopamina, que es hidroxilada a L-noradrenalina mediante la enzima dopamina-β-hidroxilasa (DBH). La fenilmetanolamina-N-metiltransferasa (PNMT) cataliza la metilación de la L-noradrenalina a L-adrenalina. El catabolismo de las catecolaminas se realiza en dos pasos: Una metilación mediante la catecolamina-O-metiltransferasa (COMT) y una desaminación con ayuda de una monoaminooxidasa (MAO). La figura 1 muestra los productos de la descomposición relevantes para el diagnóstico ácido vanilmandélico y ácido homovanílico.

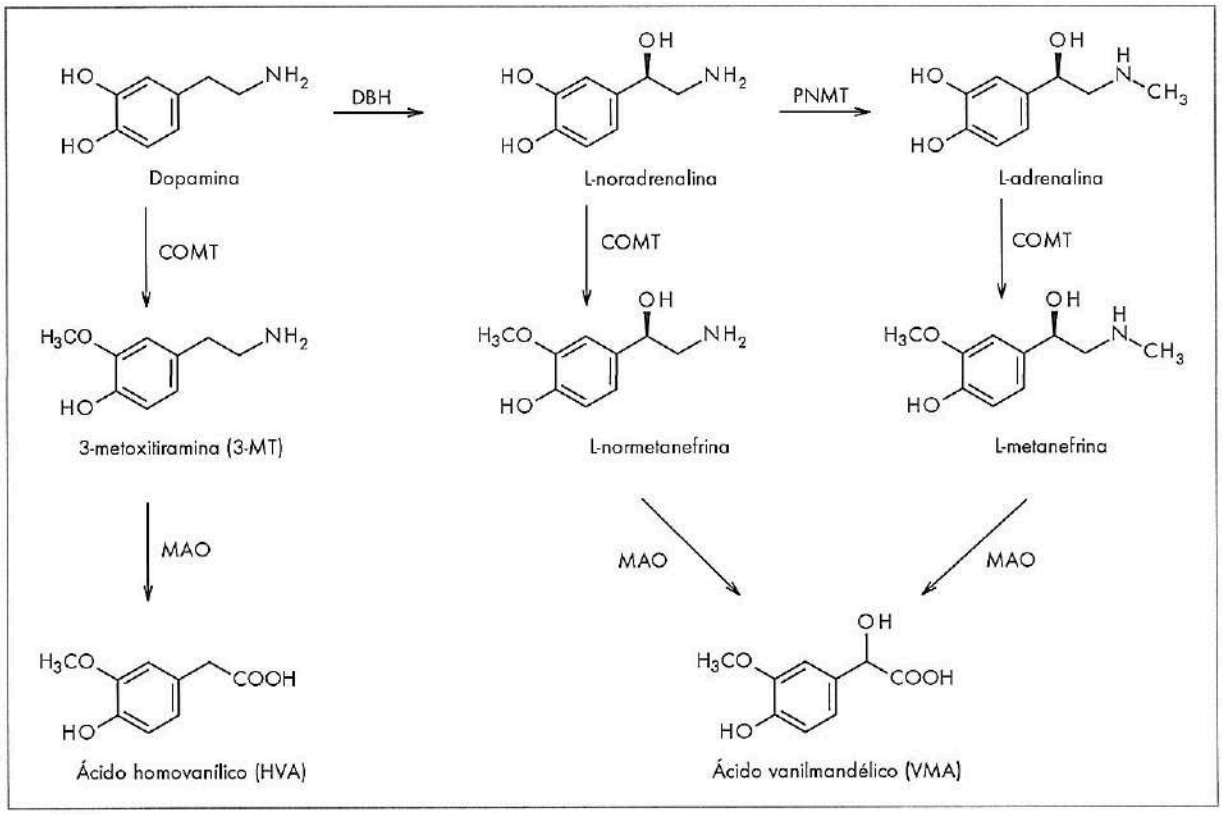


Figura 1: Metabolismo de las catecolaminas

JENIC 3031-03127599-APN-DGA#ANMAT
Ing. Susana Macias
María Cristina
Farmacéutica
M.N. 10.370

La serotonina se desamina enzimáticamente mediante una monoaminooxidasa (MAO) y a continuación se oxida con ayuda de una aldehído deshidrogenasa (ALDH) en su principal producto de eliminación, el ácido 5-hidroxiindolacético.

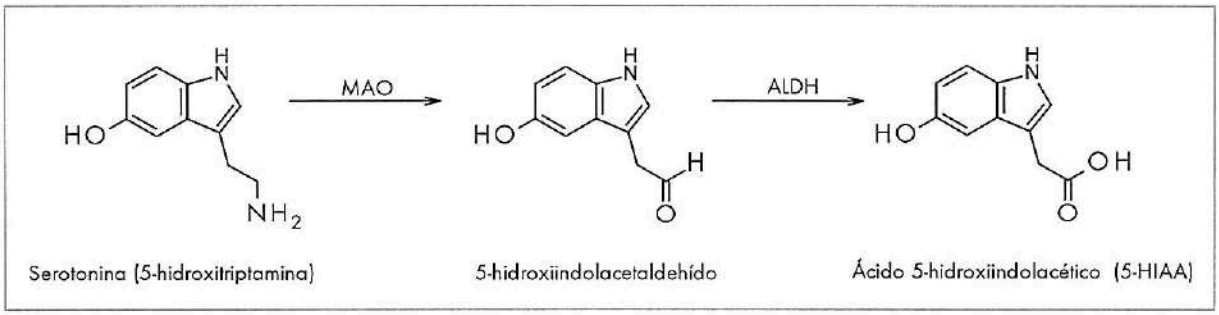


Figura 2: Metabolismo de la serotonina

Relevancia en el diagnóstico
Resulta especialmente interesante el análisis de los metabolitos VMA, HVA y 5-HIAA para el diagnóstico de tumores neuroendocrinos. Estos tumores producen, al igual que sus células originales, catecolaminas o serotonina y, en consecuencia, también aumenta la eliminación de sus productos de descomposición. Los síntomas como cefaleas paroxísticas, sudoración, presión arterial elevada y taquicardia, o rubor facial paroxístico (flush) están directamente relacionados con un aumento en la producción y liberación de sustancias mensajeras.

Neuroblastomas
Los neuroblastomas provienen de células embrionarias del tubo neural y por tanto se encuentran casi exclusivamente en niños. Pueden encontrarse tanto dentro como fuera de los riñones y producen también catecolaminas [1]. Para su diagnóstico se suelen analizar principalmente en orina los niveles de VMA, HVA y dopamina, y con menos frecuencia, también los de noradrenalina, adrenalina, normetanefrina y metanefrina [5].

Feocromocitoma y paraganglioma:
Ambos tumores producen catecolaminas. El feocromocitoma procede de los tejidos cromafines de la corteza suprarrenal, mientras que el paraganglioma prefiere formarse por fuera del riñón, en el plexo nervioso simpático de la zona abdominal y pélvica [1]. Para este cuadro clínico resulta relevante el análisis de las catecolaminas y metanefrinas en orina [4]. Aunque el análisis del metabolito VMA tiene una alta especificidad (las personas sanas obtendrán con casi toda probabilidad un resultado negativo en las pruebas), la sensibilidad es baja, lo que significa que las personas enfermas también obtienen resultados negativos en las pruebas con relativa frecuencia. Por eso no se suele usar a menudo el análisis del VMA para este tipo de tumores [4].

Tumores productores de serotonina (también: carcinoides)
Además, existe un grupo de tumores neuroendocrinos del tracto gastrointestinal que producen serotonina y por tanto desencadenan síntomas específicos (el llamado síndrome carcinoide) [2]. Principalmente se analiza el 5-HIAA en orina, la serotonina en orina sólo aumentapara un subgrupo especial de carcinoides [6].

2.2 Uso previsto

El kit de reactivos de Chromsystems VMA, HVA, 5-HIAA en orina es un producto de diagnóstico *in vitro* para su uso en laboratorios clínicos que sirve para el análisis cuantitativo del ácido vanilmandélico (VMA), del ácido homovanílico (HVA) y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en muestras humanas de orina mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Este kit se usa como prueba en pacientes en los que tiene relevancia clínica conocer el nivel en orina de estos metabolitos.

IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT
JENCK S.A.
Susana Macias
Apoderada
María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

2.3 Principio del kit de reactivos

Este kit de reactivos permite el análisis fiable de ácido vanillilmandélico, ácido homovanílico y ácido 5-hidroxiindolacético en orina por HPLC. Antes de la separación cromatográfica, estos analitos se aíslan fácilmente de la matriz de la orina utilizando una columna de intercambio iónico en el proceso de preparación de muestras.

La columna HPLC seleccionada junto con una fase móvil optimizada para la separación permiten una cuantificación cromatográfica fiable. Con el kit de reactivos de HPLC de Chromsystems, una persona puede analizar hasta 100 muestras de orina al día. Este método de análisis da resultados rápidos y fiables y permite con ello su integración fiable en la rutina del laboratorio. Con el kit de reactivos de HPLC de Chromsystems, los laboratorios con poca experiencia en HPLC también tienen la posibilidad de introducir esta tecnología a bajo coste para propósitos clínicos de rutina.

JENCK S.A.
Ing. Susana Macías
Apoderada

María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT

3 Fundamentos de la detección electroquímica

3.1 Principio

El principio de medición electroquímico aplicado con más frecuencia en la cromatografía líquida es el amperométrico con un potencial de trabajo constante. En los detectores amperométricos convencionales se utiliza una célula de medición de tres electrodos compuesta por un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia y un contraelectrodo.

El potencial (tensión de polarización) necesario para la reacción de oxidación y/o de reducción es producido entre el electrodo de referencia (normalmente Ag/AgCl) y el electrodo de trabajo. El contraelectrodo sirve para mantener el potencial y además evita un flujo de corriente hacia el electrodo de referencia. Al pasar una sustancia electroquímicamente activa por la célula de caudal, se oxida y/o se reduce. La oxidación o reducción de esta sustancia conduce a la pérdida o ganancia de electrones; la corriente resultante es registrada por un dispositivo de medición, reforzada eléctricamente, y puede ser presentada como un pico en el cromatograma.

Debido a que los grupos funcionales y estructuras químicas susceptibles a los procesos de redox son limitados, la detección electrónica destaca, además de por su alta sensibilidad, por su alta selectividad.

3.2 Influencia del potencial de trabajo

La selección del potencial de trabajo correcto es de gran relevancia para la selectividad de la medición. Lo ideal sería medir con un potencial en que la señal del detector sea máxima para la sustancia deseada, pero con el que no se detecten las posibles sustancias parásitas (sustancias acompañantes de la matriz de las muestras).

La siguente ilustración muestra la relación entre la señal del detector y el potencial de trabajo.

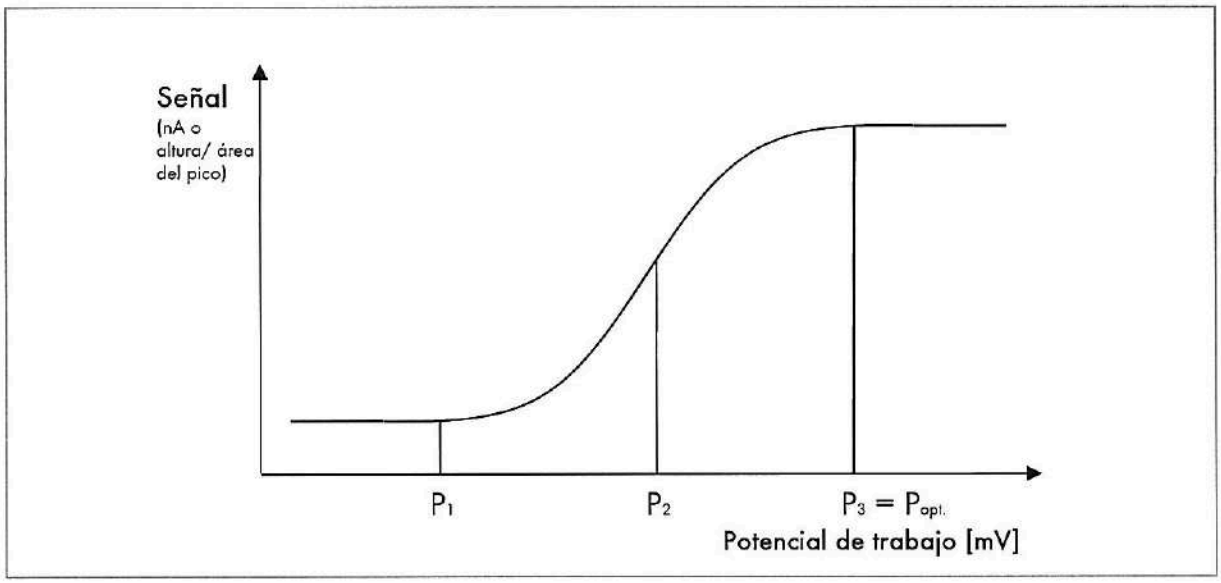


Figura 3: Relación entre el potencial de trabajo y la señal del detector

JENCK S.A.
Ing. Susana Macias
Apoderada

María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT

Si el potencial es menor que P_1, no se envía energía suficiente para activar la oxidación de las moléculas que llegan a la superficie de los colectores. Si se aumenta el potencial de P_1 a P_2, aumentará también la energía disponible. Con ello ya se convierten electroquímicamente gran parte de las moléculas que llegan a la superficie. Si se sigue aumentando el potencial, en P_3 se obtiene suficiente energía disponible para convertir todas las moléculas que llegan a la superficie de los colectores.

A partir del potencial P_3 ya no se puede lograr ningún aumento de la señal aumentando el potencial de trabajo y la señal de medición solamente depende de la concentración de la sustancia a medir: "Rango de meseta controlado por difusión". Debido a que una vez alcanzado el rango de la meseta no es posible que aumente la señal de medición, no tiene sentido medir con valores de potencial mayores que P_3. Al contrario, con potenciales superiores se pierde selectividad, ya que a más energía disponible mayor será el número de sustancias que puedan ser convertidas electroquímicamente.

3.3 Optimización del potencial de trabajo

Para la selectividad de la analítica, la dimensión del potencial de trabajo tiene una relevancia decisiva, por lo cual debería de ser optimizada. Un potencial de trabajo optimizado garantiza la más alta sensibilidad para el analito deseado y la mínima inducción parásita de otras sustancias de la muestra o de la fase móvil.

La experiencia muestra que el potencial de trabajo óptimo varía de célula medidora a célula medidora. Esto se debe a que la resistencia entre el electrodo de referencia y el electrodo auxiliar no es homogénea. Por ello, el potencial de trabajo óptimo debería determinarse empíricamente, p.ej. separando y detectando un estándar en varios potenciales. Para la optimización del potencial en la analítica de VMA-, HVA- y 5-HIAA basta con consultar las alturas de los picos de VMA e iso-VMA en el cromatograma del estándar de calibración acuoso (n° de pedido 1003/B) o el Potential Optimisation Mix (n° de pedido 1099), ya que su oxidación exige un potencial máximo.

Proceder de la siguiente manera para la optimización:

1. Ajustar el potencial de trabajo en +680 mV e inyectar un estándar de calibración (n° de pedido 1003/B) o Potential Optimisation Mix (n° de pedido 1099). Determinar las alturas de pico de VMA e iso-VMA.

2. Aumentar el potencial de trabajo en 40 mV. Inyectar un estándar de calibración (n° de pedido 1003/B) o Potential Optimisation Mix (n° de pedido 1099). Determinar las alturas de pico de VMA e iso-VMA.

3. Si la altura de pico de iso-VMA es < 70% de la altura de pico de VMA → repetir el paso 2.

4. Si la altura de pico de iso-VMA es = 70% de la altura de pico de VMA → el potencial de trabajo es óptimo.

Optimización más rápida - Potential Optimisation Mix (n° de pedido 1099)
El tiempo necesario para la optimización disminuye a la mitad al utilizar el Potential Optimisation Mix (n° de pedido 1099). Este estándar contiene solamente los analitos: VMA e iso-VMA.

El potencial de trabajo óptimo se suele encontrar entre +700 mV y +850 mV y no se ve influenciado por los trabajos de mantenimiento de rutina en la célula medidora (p.ej.: renovación de la solución KCl o activación del electrodo de trabajo). Después de intervenciones mayores en la célula de medición (p.ej. cambio del electrodo de referencia) se debería volver a optimizar el potencial de trabajo. Antes de cada serie de análisis, se debería inyectar un estándar de calibración y comparar el cromatograma obtenido con el cromatograma de referencia, recomendándose optimizar nuevamente el potencial de trabajo en caso de discrepancias significativas.

IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT
JENCK S.A.
Ing. Susana Macias
Apoderada
María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

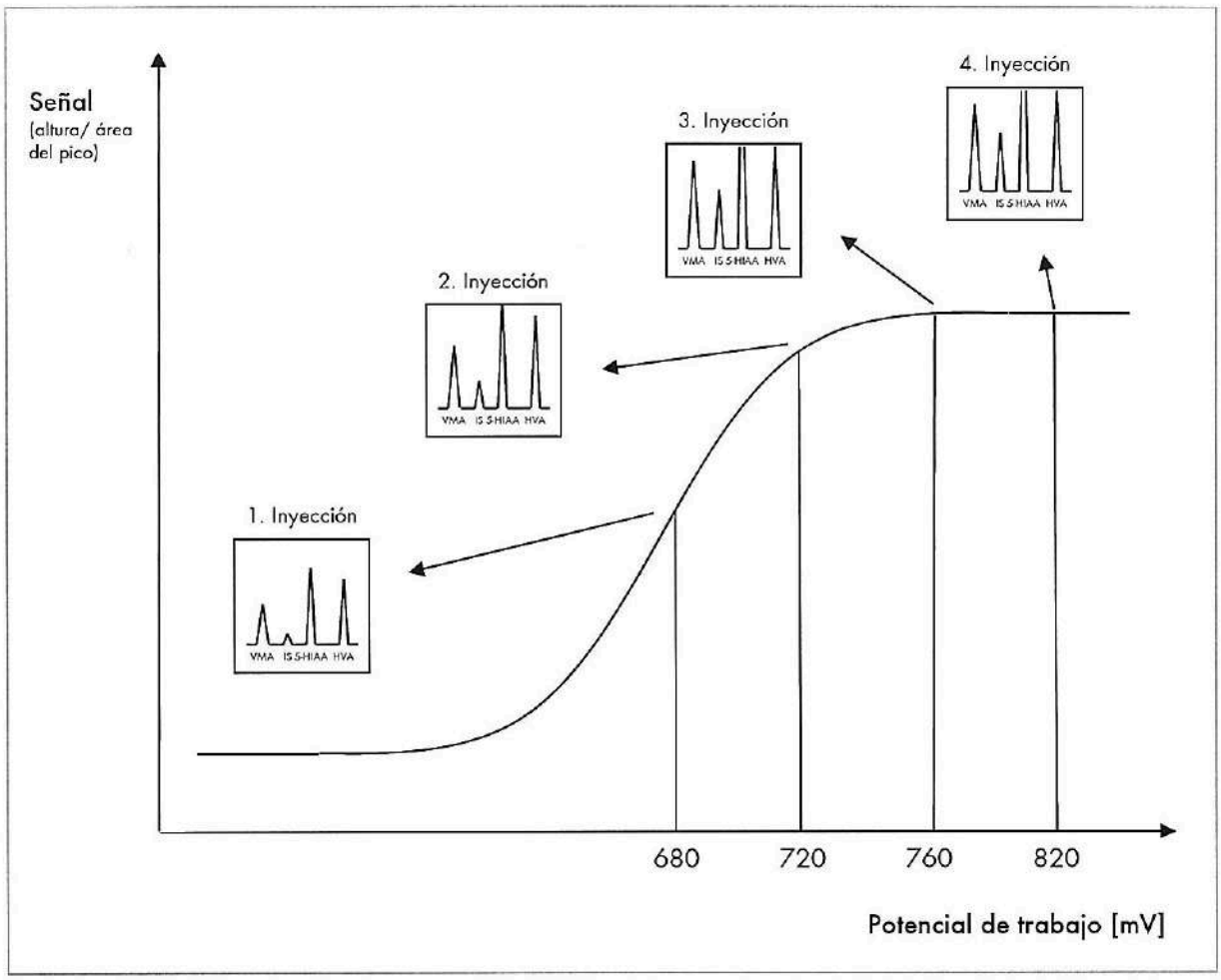


Figura 4: Optimización del potencial de trabajo

4 Sistema HPLC

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

4.1 Equipamiento y parámetros del equipo

Para la determinación de VMA, HVA, 5-HIAA en orina se precisa un sistema isocrático con bomba de HPLC, inyector y detector electroquímico. Usar un horno para columnas para evitar fluctuaciones en la temperatura y optimizar la estabilidad y reproducibilidad de la separación cromatográfica. Mantenga la fase móvil cerrada o tapada también durante el funcionamiento.

IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT
Ing. Susana Macias
Apoderada
María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

Ajustes del aparato:	
Volumen de inyección:	10-20 µl
Duración del análisis:	20 min aprox.
Velocidad de flujo:	1 ml/min*
Temperatura de la columna:	+20 hasta +25 °C
Presión de la columna:	150-160 bar aprox.
Detector electroquímico:	potencial de trabajo: +700 hasta +850 mV corriente de fondo: < 5 nA
Fluido de lavado de la aguja para el inyector:	agua/metanol, 95/5

*Esta flujo se entiende como punto de partida para una optimización y puede ser variado entre 0,8 y 1,3 ml/min.

4.2 Columna de HPLC

La columna de HPLC para la determinación de VMA, HVA, 5-HIAA se envía equilibrada y testada, lista para su uso. Puede usarse directamente. Con una velocidad de flujo de 1,0 ml/min, la contrapresión de una columna nueva es de, por lo menos, 150-160 bar. La contrapresión puede aumentar a medida que envejece la columna. Mientras las separaciones sean satisfactorias, dicho aumento de la presión no es relevante, pero no debería sobrepasar los 200 bar.

> Nota:
> Para aumentar la durabilidad de la columna se recomienda el uso de una precolumna (n° de pedido 17002 y 17001) o un prefiltro (n° de pedido 15009 y n° 15010).

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

1. Conectar la columna analítica a la bomba HPLC en la dirección de flujo
2. Lavar con unos 20 ml de fase móvil con una velocidad de flujo de 1 ml/min
3. Conectar el capilar de salida de la columna a la entrada del detector
4. Fijar un capilar de salida, a la salida del detector
5. Equilibrar el sistema con un caudal de 1 ml/min hasta que se estabilice la línea de base
6. Inyectar varias veces el estándar de calibración procesado hasta que aparezcan dos cromatogramas idénticos en sus tiempos de retención y áreas o alturas de pico

En cuanto el sistema esté equilibrado y la corriente basal sea de < 5 nA, se puede recircular la fase móvil.

4.3 Mantenimiento y cuidados del sistema HPLC

4.3.1 Pasivar la bomba y los capilares

El trabajo analítico dentro del rango de sensibilidad necesario para estos análisis exige un nivel de limpieza máximo de todos los componentes. Por ello, se deben utilizar sólo reactivos y disolventes que tengan el grado de pureza apropiado. Especialmente en la detección electroquímica, trazas de sustancias electroquímicamente activas podrían producir un ruido de fondo demasiado alto y/o picos adicionales.

La mayoría de los problemas en la detección electroquímica son atribuibles a la contaminación del circuito HPLC. Por este motivo, se recomienda una "preoxidación" (pasivación) del sistema HPLC con ácido nítrico cada 3-4 meses (dependiendo del número de muestras que se procesen).

IF-2021-83127599-APN-DGA#ANMAT
Ing. Susana Macias
Apoderada
María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

Procedimiento de pasivación:
Antes de la pasivación se deben desconectar la columna de HPLC y el detector electroquímico. En cualquier caso, la pieza capilar que va de la columna analítica a la célula detectora también se debe de pasivar, para ello, simplemente montar una pieza de unión en lugar de la columna de HPLC. Antes de lavar con ácido nítrico, se elimina el tampón de compensación lavando con agua (20 ml aprox.). A continuación, durante 20 minutos aprox, se bombea ácido nítrico al 15-20 % a través del sistema de conducciones capilares y de inyección, con una velocidad de flujo de 1-2 ml/min. La unidad de inyección debe de realizar varias veces el procedimiento de inyección (es decir: en el sistema de inyección manual cambiar varias veces de **LOAD** a **INJECT**. Y si se utiliza un Auto-inyector se cargará un vial con ácido nítrico al 15-20 % y se inyectará varias veces el máximo volumen posible).

Después de la pasivación se debe eliminar bien el ácido nítrico lavando el sistema con agua ultrapura (calidad HPLC), incluyendo aquí también, varias simulaciones del procedimiento de inyección. Cuando el valor del pH del agua de lavado sea neutro (pH 6-8), el sistema puede equilibrarse nuevamente con fase móvil.

4.3.2 Activación del electrodo de trabajo

Cuando el detector electroquímico lleva mucho tiempo en funcionamiento, es posible que se acumulen restos sobre la superficie activa del electrodo de trabajo. Esto se nota principalmente por la pérdida de sensibilidad del mismo. Para restablecer la sensibilidad, trate el electrodo de trabajo de carbón vitrificado con una solución activadora adecuada.

Si tiene preguntas sobre la activación del electrodo de trabajo, 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.

4.3.3 Mantenimiento del electrodo de referencia
(Solamente para detectores electroquímicos de Chromsystems)

Con el tiempo, los iones de la solución de electrolitos (3 M KCl) difunden hacia la fase móvil a través del diafragma, provocando que el potencial del electrodo de referencia se desplace hacia valores mayores. Para mantener un potencial del sistema de referencia definido es necesario recargar el electrodo de referencia con una solución de cloruro de potasio 3 M, por lo menos una vez a la semana. Utilizar una pipeta o similar para rellenar el electrodo de referencia con KCl 3 M, prestando especial atención en que no resulte ninguna burbuja de aire en la célula de referencia. La pieza de teflón blanca fija el electrodo de referencia a la célula medidora. En la parte inferior de la pieza, un diafragma de vidrio poroso controla la difusión de los iones entre la fase móvil y el electrodo de referencia. Si las soluciones salinas cristalizan dentro de la célula pueden provocar grietas en el diafragma, creando una fuga entre la corriente de eluentes y el interior del electrodo de referencia.

Si el electrodo de referencia Ag/AgCl lleva bastante tiempo en funcionamiento, pueden formarse cristales de cloruro de plata sobre el diafragma observándose una capa oscura sobre el mismo. El equilibrio del sistema de referencia se altera debido a este sedimento de AgCl en el diafragma, y el potencial de trabajo ajustado ya no se mantendrá constante. Para remediarlo, se puede cambiar el inserto del electrodo, o tratar de limpiar el diafragma con amoniaco al 25% (colocar la pieza de teflón en amoniaco al 25% durante toda la noche; luego lavarlo bien con agua).

IF-2021-03127599-APN-DGA#ANMAT
Ing. Susana Macias
Apoderada
María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

4.3.4 Evitar pulsaciones de la bomba

La detección electroquímica se basa en una conversión electroquímica de los analitos en la superficie del electrodo de trabajo. Por ello, la tasa de conversión se ve altamente influida por la velocidad con la que los analitos llegan al electrodo de trabajo. Debido a la pulsación de la bomba puede producirse un flujo irregular de eluentes en la célula, dando lugar a una tasa de conversión irregular de las sustancias de la muestra en la superficie del electrodo y con ello a una línea basal mucho más irregular. En las mediciones que requieren de una alta sensibilidad se recomienda equipar la bomba de HPLC con amortiguadores de pulso adicionales.

4.3.5 Pausas en el funcionamiento

Se recomienda mantener en funcionamiento del sistema equilibrado e instalado si está previsto volver a utilizar el aparato antes de una semana. En este caso el flujo puede ser reducido (0,2 ml/min) y la fase móvil recircularizada . En pausas más largas, el sistema debe ser apagado de la siguiente forma:

1. Desmontar la columna de HPLC y cerrarla bien. No es necesario realizar un procedimiento de conservación o de lavado de la columna. Para su conservación, mantener la columna de HPLC en la fase móvil.
2. Cambiar el detector electroquímico a "stand-by".
3. Lavar el sistema HPLC con aprox. 50 ml de agua/metanol (50/50).
4. Desmontar el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo del detector, lavar con agua y una vez secos guardar hasta su siguiente uso.
5. **¡Marcar el lado activado del electrodo de trabajo!**

5 Separación cromatográfica

La siguiente tabla contiene los tiempos de retención aproximados de los analitos a una velocidad de flujo de 1 ml/min.

Tabla 1: Tiempos de retención

Sustancia	Tiempo de retención (aprox.)
VMA	3,0 min
Estándar interno (iso-VMA)	4,0 min
5-HIAA	9,4 min
HVA	13,4 min
Estándar interno (HICA)	14,8 min

La duración de la separación cromatográfica (inclusive HICA) es de 20 min aprox. con una velocidad de flujo de 1,0 ml/min. Los tiempos de retención pueden variar ligeramente, por ejemplo si cambia la temperatura ambiente, al usar un nuevo lote de fase móvil o al cambiar la columna HPLC. Por tanto, establezca los valores actuales mediante un cromatograma de calibración.

IF-2021-03125599-APN-DGA#ANMAT
Ing. Susana Macias
Apoderada
María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

6 Preparación de muestras

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

Las muestras pueden prepararse también de forma automatizada con un Gilson® ASPEC™. Siga para ello las instrucciones del anexo I.

6.1 Obtención y conservación de las muestras de los pacientes

El material de análisis es orina.

Normalmente se usa para el análisis la orina de 24 horas. Si obtenerla resultara muy difícil o imposible, también se puede analizar la orina espontánea. En ese caso los resultados harán referencia a la creatinina.

Análisis de VMA/HVA [4]:
Para el análisis del VMA y el HVA debe reunirse orina de 24 horas en un recipiente adecuado con 10 ml de ácido clorhídrico al 10-25 %. La orina así obtenida se conserva estable a temperatura ambiente siete días, a +2 hasta +8 °C, 14 días, y a -20 °C, hasta 3 meses.

Análisis de 5-HIAA [6]:
Para el análisis de 5-HIAA hay que recolectar orina de 24 horas en un recipiente adecuado y almacenarla protegida de la luz a +2 hasta +8 °C. Sólo hace falta acidificar la orina si esta se va a enviar por correo o si se recoge a temperatura ambiente. En ese caso, hay que introducir previamente en el recipiente entre 10 y 20 ml de ácido acético glacial.

Las orinas así obtenidas deben tener un pH alrededor de 4,0 y se conservan protegidas de la luz hasta dos semanas a temperaturas de +2 hasta +8 °C.

Nota:
La orina mezclada con ácido clorhídrico debe ajustarse a un pH de 4,0 a 6,0 con hidróxido sódico y ser analizada lo antes posible. Las orinas muy acidificadas (pH < 1,0), pueden provocar tasas disminuidas de recuperación en la preparación de las muestras, debido a la alta concentración de cloruro.

Los siguientes alimentos contienen grandes cantidades de serotonina, su consumo provoca un aumento en la eliminación de 5-HIAA a través de la orina. Por ello, es imprescindible que el paciente se abstenga de su consumo en los 3-4 días anteriores, así como durante, a la recolección de la muestra:

- Aguacates
- Berenjenas
- Ciruelas amarillas
- Grosellas
- Higos
- Kiwis
- Melones y sandía
- Nueces
- Piña
- Plátanos
- Tomates
- Uva espina

Los principios activos o medicamentos que se indican a continuación pueden influir en los valores de 5-HIAA en orina:
- Aumento del resultado del análisis: Acetanilida, cafeína, cumarina, efedrina HCl, mefenesina, metanfetamina, metocarbamol, nicotina, paracetamol, fenacetina, fenobarbital, fentolamina
- Disminución del resultado del análisis: Aspirina, clorpromazina, isoniazida, levodopa, metenamina, prometazina, estreptozocina

IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT
JENCK S.A.
Susana Macias
Apoderada
María Cristina Vescin
Farmacéutica
M.N. 10.370

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.

6.2 Reconstitución del estándar de calibración acuoso

Antes de preparar las muestras, reconstituya el estándar de calibración acuoso (n° de pedido 1003/B) como se indica a continuación:

1. Pipetear 1000 µl de HCl 0,2 M en el recipiente original
2. Mezclar bien la solución durante 10 min

Los valores de los estándares de calibración son trazables a pesadas de las sustancias puras (véase Capítulo 6.1).

El estándar de calibración reconstituido de esta manera debería prepararse a diario, ya que el 5-HIAA es inestable en un medio muy ácido. El almacenamiento del estándar de calibración durante un tiempo más prolongado es posible solamente si la liofilización se reconstruye con H_2O en lugar de HCl y conservándolo a temperaturas de menos de −18 °C. Sin embargo, antes de la cromatografía se tienen que ajustar las alícuotas descongeladas en una concentración de HCL de 0,2 M.

Ejemplo:
1. Reconstituir el estándar de calibración en 800 µl H_2O.
2. Distribuir en 5 alícuotas de 160 µl cada una.
3. Congelar a temperaturas de menos de −18 °C.
4. Después de descongelar, añadir 40 µl de HCl 1 M a cada alícuota.

Alternativamente, la reconstitución del estándar de calibración con el tampón de elución (950 µl + 50 µl Finisher) permite que la mezcla se puede almacenar refrigerada (+2 hasta +8 °C) hasta 5 días.

6.3 Reconstitución del estándar de calibración de orina

Antes de preparar las muestras, reconstituya el estándar de calibración de orina (n° de pedido 1009) como se indica a continuación:

1. Pipetear 5,0 ml de agua destilada en el recipiente original
2. Reconstituir entre 10 y 15 minutos a una temperatura de +20 a +25 °C, agitar repetidamente

Comprobar que el contenido del recipiente sea homogéneo. Si todavía pueden apreciarse sustancias sin disolver, prolongar el tiempo de reconstitución. ¡Evitar la luz del sol directa!

Los valores de los estándares de calibración son trazables a pesadas de las sustancias puras. Las concentraciones de los analitos en el estándar de calibración dependen del lote. Encontrará cada uno de los valores en la hoja de información del estándar de calibración.

¡Atención!:
Este producto ha sido producido a partir de un pool de orina humana. 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.

IF-2021-83127599-APN-DGA#ANMAT
SENOR S.A.
Ing. Susana Macias
Apoderada
María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

Estabilidad del estándar de calibración tras la reconstitución:
El estándar de calibración disuelto en agua se conserva como se indica a continuación:

Tabla 2: Estabilidad del estándar de calibración tras la reconstitución

Temperatura de almacenamiento	Estabilidad	Otras condiciones de almacenamiento
+2 hasta +8 °C	5 días	protegido de la luz, cerrado herméticamente
a menos de -18 °C	3 meses*	protegido de la luz, cerrado herméticamente

*Para 5-HIAA la estabilidad es de 1 mes a menos de -18 °C.

6.4 Reconstitución de los controles

Antes de preparar las muestras, reconstituya los controles de orina (n° de pedido 0040, 0050) como se indica a continuación:

1. Pipetear 8,0 ml de agua destilada en el recipiente original
2. Reconstituir entre 10 y 15 minutos a una temperatura de +20 a +25 °C, agitar repetidamente

Comprobar que el contenido del recipiente sea homogéneo. Si todavía pueden apreciarse sustancias sin disolver, prolongar el tiempo de reconstitución. ¡Evitar la luz del sol directa!

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 orina humana. 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.

Estabilidad de los controles tras la reconstitución:
Los controles disueltos en agua se conservan como se indica a continuación:

Tabla 3: Estabilidad de los controles tras la reconstitución

Temperatura de almacenamiento	Estabilidad	Otras condiciones de almacenamiento
+2 hasta +8 °C	5 días	protegido de la luz, cerrado herméticamente
a menos de -18 °C	3 meses*	protegido de la luz, cerrado herméticamente

*Para 5-HIAA la estabilidad es de 1 mes a menos de -18 °C.

IF-2021-83127599-APN-DGA#ANMAT
BENCK S.A.
Ing. Susana Macias
Apoderada
María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

6.5 Uso de estándares internos

6.5.1 Estándar interno iso-VMA

El estándar interno (iso-VMA, n° de pedido 1004/B) se encuentra regulado, de manera que al añadirse a la muestra conlleva directamente el ajuste del pH requerido.

La concentración del estándar interno es de 0,5 mg/l (= 0,5 µg/ml) iso-VMA.

6.5.2 Estándar interno HICA para el análisis por HPLC de 5-HIAA

Añadiendo el estándar interno (HICA, n° de pedido 51303/B) a la preparación del estándar de calibración y de las muestras de orina, aumenta considerablemente la precisión del análisis de 5-HIAA.

Preparación del estándar de calibración HICA:

1. Pipetear 975 µl de HCl 0,2 M en el recipiente original del estándar de calibración acuoso (n° de pedido 1003/B)
2. Añadir 25 µl Internal Standard (HICA, n° de pedido 51303/B)
3. Mezclar bien la solución durante 10 min

El Calibration Standard reconstituido así se puede inyectar directamente en el sistema HPLC.

6.6 Preparación de muestras

6.6.1 Tamponamiento de las muestras de orina

Sólo iso-VMA como estándar interno:
1. Pasar 50 µl de muestra de orina a un recipiente adecuado (p.ej. tubo de reacción de 1,5ml)
2. Añadir 1,0 ml Internal Standard (iso-VMA, n° de pedido 1004/B)
3. Mezclar brevemente

Iso-VMA e HICA como estándar interno:
1. Pasar 50 µl de muestra de orina a un recipiente adecuado (p.ej. tubo de reacción de 1,5ml)
2. Añadir 1,0 ml Internal Standard (iso-VMA, n° de pedido 1004/B)
3. Añadir 50 µl Internal Standard (HICA, n° de pedido 51303/B)
4. Mezclar brevemente

No es necesario ajustar el pH.

IF-2021-03127599-APN-DGA#ANMAT
Ing. Susana Macias
Apoderada
María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

6.6.2 Preparación de muestras con columnas de intercambio aniónico

Para preparar las muestras de los pacientes, controles y estándares de calibración para su análisis, realice los siguientes pasos en el orden indicado:

1. Introducir el volumen total de la orina tamponada (véase Cap. 5.6.1) en una columna de preparación de muestra, aplicar vacío o centrifugar (hasta un máximo de 700 x g), eliminar el eluido
2. Introducir 3,0 ml de Wash Buffer I en la columna, aplicar vacío o centrifugar (hasta un máximo de 700 x g), eliminar el eluido
3. Introducir 3,0 ml de Wash Buffer II en la columna, aplicar vacío o centrifugar (hasta un máximo de 700 x g), eliminar el eluido
4. Repita el paso 3 una vez
5. Introducir 2 ml de Elution Buffer en la columna, aplicar vacío o centrifugar (hasta un máximo de 700 x g), recoger el eluido
6. Añadir 100 µl de Finisher al eluido, mezclar brevemente
7. Inyectar 10-20 µl del eluato en el sistema de HPLC

Nota:
En orinas muy acidificadas (pH < 1,0) se produce una capacidad de enlace muy escasa en las columnas de preparación de muestras (sobrecarga), debido a una alta concentración de cloruros. En estos casos, se debe diluir la orina 1:1 con agua ultrapura (calidad HPLC) antes del taponamiento.

6.7 Estabilidad de las muestras preparadas

Las muestras preparadas para la determinación, siguiendo las indicaciones del capítulo 5.6, se conservan como se indica a continuación:

Tabla 4: Estabilidad de las muestras preparadas

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

Se desaconseja totalmente almacenar las muestras preparadas más tiempo, incluso aunque estén congelados (a menos de -18°C).

7 Registro de datos y cálculo

7.1 Calibración del sistema de cálculo

Para calibrar su sistema de cálculo y comprobar la capacidad de separación del sistema de HPLC, antes de analizar las muestras de los pacientes, realice análisis de prueba. Utilice para ello el estándar de calibración de orina procesado (n° de pedido 1009) o el estándar de calibración acuoso (n° de pedido 1003/B). La concentración de los analitos en los estándares de calibración depende del lote. Encontrará los valores exactos en la hoja de información adjunta.

IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT
JENCK S.A.
Ing. Susana Macias
Apoderada
María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

Inyecte, de forma repetida, una alícuota del estándar de calibración de orina procesado o del estándar de calibración acuoso hasta que dos cromatogramas consecutivos sean prácticamente idénticos en sus tiempos de retención, resolución de pico y alturas o áreas de pico. Use el cromatograma de la última inyección de prueba para calibrar el sistema de cálculo (software, integrador).

Para comprobar si las condiciones de HPLC (tiempos de retención, parámetros de la calibración) se mantienen constantes durante todo la determinación, inyecte el calibrador nuevamente durante y al final de una serie de muestras. Para la calibración, escoger en el sistema de cálculo el "método estándar interno".

7.2 Cálculo cuantitativo con estándar interno

El estándar interno ayuda a compensar las posibles pérdidas que puedan presentarse durante la preparación de las muestras. Para ello se añadirá a la muestra (calibrador, controles, muestras de los pacientes) una cantidad definida del estándar interno. En el software de evaluación se asignará el pico correspondiente del proceso de calibración definido como estándar interno en el cuadro de componentes (en este caso, iso-VMA o iso-VMA/HICA). Además se pondrán las concentraciones de cada uno de los analitos en el estándar de calibración.

Concentraciones de las soluciones del estándar interno:
iso-VMA (1004/B): 0,50 µg/ml
HICA (51003/B): 10,00 µg/ml

Ejemplo:
A 50 µl de muestra de orina se le añade 1,0 ml de la solución del estándar interno (0,5 µg/ml iso-VMA). La concentración final del estándar interno en la muestra de orina es de 10 µg/ml (= 10 mg/l) iso-VMA.

y para el HICA-ISTD:
A 50 µl de muestra de orina se le añaden 50 µl de la solución del estándar interno (10 µg/ml HICA, véase capítulo 6.5, 6.6). La concentración final del estándar interno en la muestra de orina es de 10 µg/ml (= 10 mg/l) HICA.

En su software de cálculo, introducir **"10 mg/l"** como concentración de los estándares internos en las muestras a medir. El sistema calcula directamente las concentraciones de los analitos en la muestra desconocida en valores de mg de sustancia por litro de orina. Para calcular la eliminación en 24 horas en VMA, HVA y 5-HIAA, solamente se tiene que multiplicar el valor expresado por la cantidad de orina (en l). El calibrador y el estándar interno son trazables a patrones de sustancias puras obtenidas de un proveedor certificado.

8 Control de calidad

Compruebe la precisión y exactitud de las determinaciones incluyendo controles adicionales en cada serie de análisis (n° de pedido 0040, 0050). Si los valores están fuera de los rangos indicados en la hoja de información de los controles, hay que revisar el sistema. Si se mantiene la desviación, vuelva a calibrar el sistema.

JENCK S.A.
Ing. Susana Macias
Apoderada

María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT

9 Rangos de referencia

Los rangos de referencia para las aminas biógenas son muy diferentes, y dependen en especial de la edad y del sexo. Se recomienda que cada laboratorio determine sus rangos de referencia específicos.

Tabla 5: Rangos de referencia bibliografía [4]

Colectivo de pacientes	Rangos de referencia		
Niños	VMA	HVA	5-HIAA
0-2 semanas	0-850 µg/24 h	0-1500 µg/24 h	—
2-8 semanas	0-1300 µg/24 h	0-2000 µg/24 h	—
2-6 meses	0-1500 µg/24 h	0-2900 µg/24 h	—
7-12 meses	0-1700 µg/24 h	0-3400 µg/24 h	—
1-5 años	0-2200 µg/24 h	0-4800 µg/24 h	—
6-10 años	0-3600 µg/24 h	0-6900 µg/24 h	—
11-15 años	0-4800 µg/24 h	0-8800 µg/24 h	—
Adultos	1600-7300 µg/24 h	1800-6900 µg/24 h	< 8200 µg/24 h

Tabla 6: Rangos de referencia bibliografía [6]

Colectivo de pacientes	Rangos de referencia		
Niños	VMA	HVA	5-HIAA
0-1 años	≤ 18800 µg/g creatinina	≤ 32600 µg/g creatinina	–
2-4 años	≤ 11000 µg/g creatinina	≤ 22000 µg/g creatinina	–
5-9 años	≤ 8300 µg/g creatinina	≤ 15100 µg/g creatinina	–
10-19 años	≤ 8300 µg/g creatinina	≤ 12800 µg/g creatinina	–
Adultos	≤ 5500 µg/g creatinina	≤ 7600 µg/g creatinina	2000-8000 µg/24 h

Tabla 7: Rangos de referencia bibliografía [8]

Colectivo de pacientes	Rangos de referencia	
Alter	VMA	HVA
0-3 meses	3000-18900 µg/g creatinina	6400-35000 µg/g creatinina
3-6 meses	2900-21800 µg/g creatinina	12500-32100 µg/g creatinina
6-12 meses	4900-16900 µg/g creatinina	9000-31400 µg/g creatinina
1-2 años	2500-15500 µg/g creatinina	5700-27300 µg/g creatinina
2-5 años	2100-10300 µg/g creatinina	2700-23500 µg/g creatinina
5-10 años	1100-7600 µg/g creatinina	1100-16500 µg/g creatinina
10-15 años	1000-5600 µg/g creatinina	1100-9700 µg/g creatinina
15-20 años	700-4300 µg/g creatinina	1400-5800 µg/g creatinina
20-25 años	400-4600 µg/g creatinina	600-5200 µg/g creatinina

JENCK S.A.
Ing. Susana Macias
Apoderada
María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT

Nota
Los rangos de referencia indicados han sido extraídos de la bibliografía y deben tomarse únicamente como sugerencia. Tenga en cuenta que no existen rangos de referencia de validez universal para las aminas biógenas/metabolitos en orina. No es posible comparar valores obtenidos mediante métodos de análisis diferentes. Los laboratorios deberán indicar el método empleado en el análisis para una correcta interpretación de los resultados.

10 Factores de conversión

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

Tabla 8: Factores de conversión

Sustancia	mg/l en µmol/l	µmol/l en mg/l
VMA	x 5,04	x 0,198
HVA	x 5,49	x 0,182
5-HIAA	x 5,23	x 0,191

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 9: Condiciones de transporte del kit de reactivos:

Producto	Temperatura de transporte
Kit de reactivos (n° de pedido 1000/B)	+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 10: Condiciones de almacenamiento de los reactivos:

Producto	Temperatura de almacenamiento
Mobile Phase (n° de pedido 1011, 1012)	+18 hasta +30 °C
Estándar de calibración acuoso (n° de pedido 1003/B)	+2 hasta +8 °C
Estándar de calibración de orina (n° de pedido 1009)	+2 hasta +8 °C
Internal Standard (n° de pedido 1004/B)	+2 hasta +8 °C
Wash Buffer I (n° de pedido 1005)	+18 hasta +30 °C

JENCK S.A.
Ing. Susana Macias
Apoderada

IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT

María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

Producto	Temperatura de almacenamiento
Wash Buffer II (n° de pedido 1006)	+18 hasta +30 °C
Elution Buffer (n° de pedido 1077)	+18 hasta +30 °C
Finisher (n° de pedido 1013)	+18 hasta +30 °C
Controles de orina (n° de pedido 0040, 0050)	+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, 5.3 y 5.4.

12 Tratamiento de los residuos

La Mobile Phase contiene disolventes orgánicos. Verter los restos en el contenedor para disolventes orgánicos no halogenados.

El Finisher es una base fuerte, el Elution Buffer es un ácido fuerte. Neutralizar las soluciones y verterlas en un contenedor para soluciones salinas.

Los restos de las muestras de pacientes y muestras procesadas, así como los controles y estándares de calibración 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.

JENCK S.A.
Ing. Susana Macías
Apoderada

María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT

13 Ejemplos de cromatogramas

Las siguientes imágenes muestran ejemplos de varios cromatogramas obtenidos con este método.

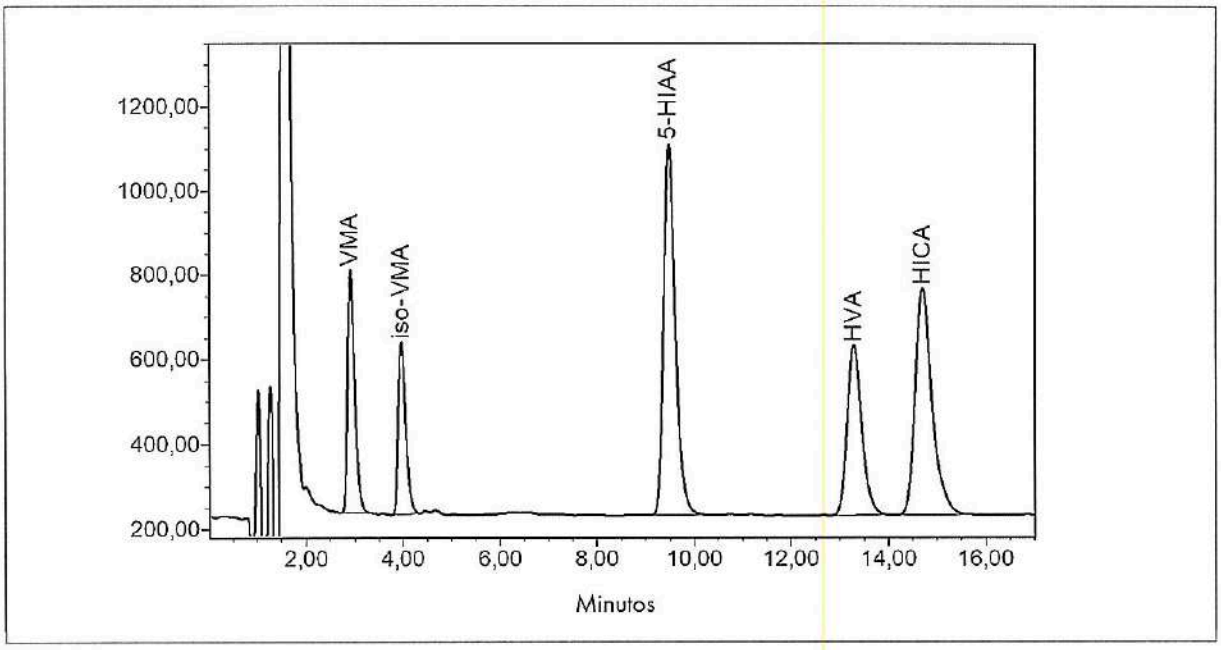


Figura 5: : Cromatograma de un estándar de calibración (con iso-VMA y HICA como estándar interno); velocidad de flujo 1,0 ml/min
Concentración del analito: VMA: 0,25 mg/l; 5-HIAA: 0,25 mg/l; HVA: 0,25 mg/l

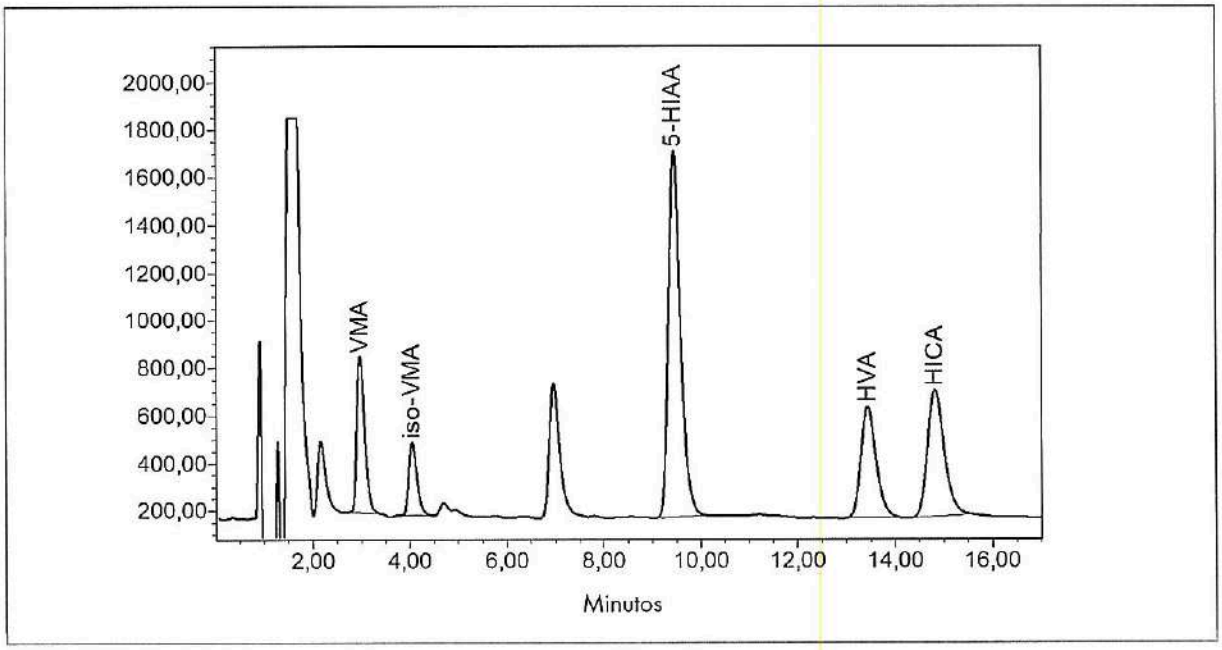


Figura 6: Cromatograma de un control de orina (con iso-VMA y HICA como estándar interno); velocidad de flujo: 1,0 ml/min
Concentración del analito: VMA: 15,5 mg/l; 5-HIAA: 21,5 mg/l; HVA: 14,1 mg/l

IF-2024-93127599-APN-DGA#ANMAT
JENCK S.A.
Ing. Susana Macias
Apoderada
María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

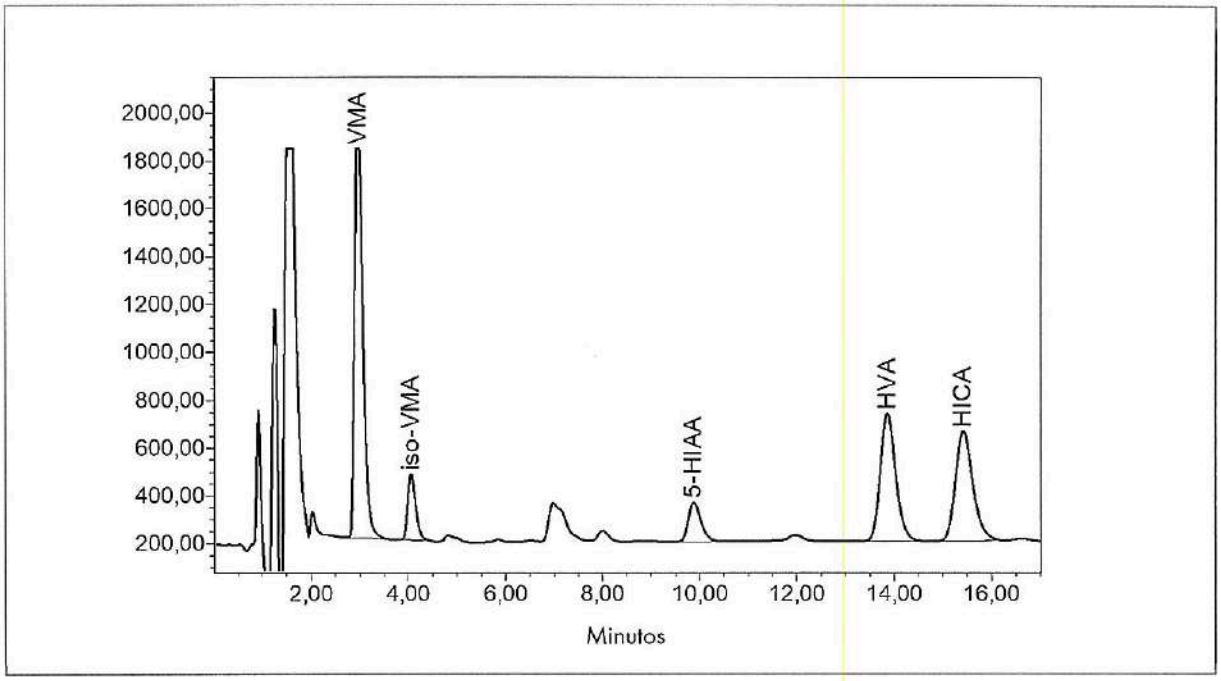


Figura 7: Cromatograma de una muestra de un paciente (con iso-VMA y HICA como estándar interno); velocidad de flujo: 1,0 ml/min
Concentración del analito: VMA: 46,3 mg/l; 5-HIAA: 2,8 mg/l; HVA: 21,0 mg/l

14 Limitaciones clínicas

No existen rangos de referencia de validez universal para los analitos del kit de reactivos VMA, HVA, 5-HIAA en orina. No es posible comparar valores obtenidos mediante métodos de análisis diferentes. Los laboratorios deberán indicar el método empleado en el análisis para una correcta interpretación de los resultados.

Cada usuario deberá establecer sus propios rangos de referencia basados en evaluaciones clínicas. No se deben emplear factores de conversión entre los diferentes métodos de análisis para predecir los valores de un paciente.

JENCK S.A.
Ing. Susana Macias
Apoderada

IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT

María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

15 Localización y resolución de problemas

Tabla 11: Medidas en caso de avería

Problema	Causa posible	Solución
Línea basal irregular	Contaminación del sistema HPLC con impurezas electroquímicamente activas	Pasivar la bomba, los capilares y el sistema de inyección con ácido nítrico
	Formación de grietas en el diafragma	Cambiar la pieza de teflón
	Sedimentos en el diafragma del sistema de referencia	Limpiar el diafragma con amoniaco al 25 % o cambiarlo
La línea basal muestra oscilaciones rítmicas	Juntas de las cabezas de la bomba HPLC dañadas	Comprobar la bomba HPLC para descartar fugas Comuníquese con el servicio de asistencia si fuera necesario
	Impurezas o productos de reacción sobre la superficie del electrodo de trabajo	Limpiar el electrodo de trabajo
	Pared interior de la célula medidora dañada (arañazos)	Cambiar o hacer reparar la célula
	La célula medidora de su detector electroquímico no es hermética	Comprobar la célula medidora para descartar fugas Con cuidado, ajustar un poco más el tornillo de presión Cambiar la junta de la célula
	Burbujas de aire en el sistema de la bomba; pulsación de la bomba	Purgar la bomba
Línea basal inestable	El sistema aún no está equilibrado	Bombear la fase móvil en el circuito durante largo rato
	Variaciones en la temperatura ambiente	Garantizar que la temperatura ambiente sea constante Si se presentaran regularmente grandes oscilaciones de temperatura, termostatizar la columna de HPLC
Alta corriente basal	Contaminación del sistema de HPLC con impurezas electroquímicamente activas	Pasivar la bomba, los capilares y el sistema de inyección con ácido nítrico
	Fase móvil contaminada	Cambiar la fase móvil
	Columna de HPLC contaminada	Cambiar la columna de HPLC
	Suciedad o productos de reacción sobre la superficie del electrodo de trabajo	Limpiar el electrodo de trabajo
Disminución de la sensibilidad del detector; pérdida de la señal	Impurezas o productos de reacción sobre la superficie del electrodo de trabajo	Limpiar el electrodo de trabajo

JENCK S.A.
Susana Mapas
Apoderada

María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

IF-2021-9312-599-APN-DGA#ANMAT

Problema	Causa posible	Solución
	Disminución del potencial de trabajo	Comprobar el potencial adyacente entre el colector y el electrodo de referencia. En caso de potencial demasiado bajo, controlar el sistema de electrodos de referencia
Picos desconocidos en el cromatograma	Sistema de inyección sucio	Lavar el sistema de inyección primero con agua y luego con alcohol isopropílico. Accionar la válvula de inyección varias veces durante la fase de lavado. Al utilizar un Autosampler, llevar a cabo el proceso de inyección varias veces durante el proceso de lavado
	Jeringuilla de inyección sucia	Lavar la jeringuilla con alcohol isopropílico y agua. Si fuese necesario, lavar brevemente con ácido nítrico al 15-20 %
	Contaminación del sistema HPLC con impurezas electroquímicamente activas	Pasivar la bomba, los capilares y el sistema de inyección con ácido nítrico
	Columna de HPLC contaminada	Cambiar la columna HPLC
	Material de hermetización inadecuado en el sistema de inyección	Los sistemas de conmutación de inyección están equipados normalmente con juntas de rotor de material VESPEL. Sin embargo, las juntas VESPEL se desgastan con el tiempo. Por ello, en la detección electroquímica se producen picos perturbadores. Generalmente, se deberían de utilizar juntas de rotor de material TEFZEL
Tiempos de retención modificados	Oscilación de la temperatura ambiente	Garantizar una temperatura ambiente constante. Termostatizar la columna de HPLC
	La velocidad de flujo oscila	Controlar la velocidad de flujo. Si la bomba de HPLC funciona irregularmente, controlar si hay burbujas de aire en el circuito del sistema. Comuníquese con el servicio técnico si fuera necesario
Picos dobles	Volumen muerto a la entrada de la columna de HPLC	Llenar con material de relleno la cabeza de columna (fase estacionaria), si fuera necesario, cambiar la columna
	Grietas en el relleno de la columna	Cambiar la columna HPLC
	Volumen muerto en el sistema de inyección	Controlar el asiento del bucle de muestra. Controlar las perforaciones de las obturaciones de devanado
Discontinuidades en todos los picos	Volumen muerto en el sistema	Controlar la cabeza de columna Comprobar que todos los extremos de los capilares estén bien ajustados

JENCK S.A.
Ing. Susana Macías
Apoderada

IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT

María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

Problema	Causa posible	Solución
Picos anchos; colas	Capacidad de rendimiento de la columna de HPLC agotada	Cambiar la columna HPLC
Contrapresión alta	Acumulación de partículas sobre la columna analítica	Cambiar la columna HPLC o la precolumna
	Sistema de inyección obturado	Lavar el sistema de inyección varias veces con agua y luego con alcohol isopropílico

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.

16 Bibliografía

1. Lattke P, Peitzsch M, Därr R, Siegert G, Eisenhofer G. (2013) Labordiagnostik Katecholamin-produzierender Tumoren. *J Lab Med* **37**(4): 187-97.

2. Klöppel G, Perren A, Heitz PU. (2003) Vom Karzinoid zum neuroendokrinen Tumor. *Dtsch Arztebl* **100**:A 1932-42.

3. Eisenhofer G, Peitzsch M. (2014) Laboratory evaluation of pheochromocytoma and paraganglioma. *Clin Chem* **60**(12):1486-99.

4. Gressner AM, Arndt T (Hrsg). Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. 2. Aufl, Band 1, Springer Medizin Verlag Heidelberg (2013).

5. Grouzmann E, Lamine F. (2013) Determination of catecholamines in plasma and urine. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **27**(5):713-23.

6. Thomas L (Hrsg). Labor und Diagnose. 8. Aufl, Verlag TH-Books Frankfurt/Main (2012).

7. Feldman JM. (1986) Urinary serotonin in the diagnosis of carcinoid tumors. *Clin Chem* **32**(5): 840-4.

8. Pussard E, Neveux M, Guigueno N. (2009) Reference intervals for urinary catecholamines and metabolites from birth to adulthood. *Clin Biochem* **42**(6):536-9.

JENCK S.A.
Ing. Susana Macias
Apoderada

María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

IF-2021-03127590-APN-DGA#ANMAT

Apéndice I: Preparación automatizada de muestras con Gilson® ASPEC™

Racks ASPEC™

El programa Chromsystems ASPEC™ para VMA, HVA, 5-HIAA en orina precisa los siguientes racks de muestras/reactivos:

- Rack de muestras, código 28
- Rack de solventes, código 61
- Racks desplazables DEC, código 101 (máx. 3 unidades) con sus correspondientes racks y viales colectores.

Tabla 12: Colocación de los racks

Reactivo	Rack	Posición
Muestras	Rack de muestras	1-52
Tubos vacíos	Rack de muestras	55-106 (mismo número que de muestras)
Finisher (n° de pedido 1013/A)	Rack de muestras	107-108
Internal Standard (n° de pedido 1044/B/A)	Rack de solventes	109
Wash Buffer 1 (n° de pedido 1005/A)	Rack de solventes	110
Wash Buffer 2 (n° de pedido 1006/A)	Rack de solventes	111
Elution Buffer (n° de pedido 1077/A)	Rack de solventes	112
Sample Clean Up Columns (n° de pedido 1008/A)	Rack (s) DEC	113-220
Tubos vacíos ("Collect" - colección)	Rack (s) colectores	según el número de los cartuchos SPE
Agua destilada	Reservorio	

Opción:
Para mejorar todavía más la analítica de 5-HIAA, puede usarse HICA (n° de artículo 51303/B) como estándar interno adicional. En ese caso, hay que modificar la posición de los racks como se indica en la siguiente tabla:

Tabla 13: Colocación de los racks usando HICA como estándar interno

Reactivo	Rack	Posición
Muestras	Rack de muestras	1-51
Tubos vacíos	Rack de muestras	55-105 (mismo número que de muestras)
Internal Standard (HICA; n° de pedido 51303/B)	Rack de muestras	106
El resto de reactivos se colocan igual que arriba	Solvente, DEC, Rack (s) colectores	igual que arriba

JENOK S.A.
Ing. Susana Macias
Apoderada

María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT

¡Antes de iniciar una secuencia de análisis hay que lavar manualmente el "dilutor" con el líquido del reservorio (ir a menú, MANUAL - Prime dilutor)!

Cada muestra precisa los siguientes volúmenes de reactivos:

Tabla 14: Volúmenes de reactivos necesarios

Reactivo	Cantidad
Finisher (n° de pedido 1013/A)	100 µl*
Internal Standard (n° de pedido 1044/B/A)	1,0 ml
Wash Buffer 1 (n° de pedido 1005/A)	2,0 ml
Wash Buffer 2 (n° de pedido 1006/A)	4,0 ml
Elution Buffer (n° de pedido 1077/A)	2,0 ml
En caso de usarlo:	
Internal Standard (HICA; n° de pedido 51303/B)	50 µl

Hay que colocar en el correspondiente recipiente la cantidad de reactivos adecuada para el número de muestras, más un volumen adicional de unos 30 ml.

*** Para el Finisher:** Dependiendo del número de muestras utilizadas se llenará a continuación el vial n° 107 con hasta 3,5 ml. Si hay que analizar más de 35 muestras, eche la cantidad adicional necesaria de Finisher en el vial n° 108.

Principio del programa™ ASPEC

Usar el ASPEC™ para mezclar 50 µl de cada muestra de orina con 1,0 ml de Internal Standard en un vial vacío. ¡El Internal Standard contiene un tampón para diluir y ajustar el pH, por lo que, antes de la extracción, **no es necesario corregir manualmente el pH!**

La orina diluida pasa por todo el proceso de preparación de muestras (SPE con pasos de lavado y elución). Los eluatos obtenidos pueden inyectarse directamente en el sistema de HPLC.

El disquete ASPEC™ contiene dos programas:

"VMA":

¡El ASPEC™ debe estar correctamente conectado al sistema de HPLC! Este programa controla toda la preparación de muestras para analizar VMA, HVA y 5-HIAA en orina. Los eluatos preparados se inyectan automáticamente en el sistema de HPLC y se inicia la cromatografía. Durante el análisis por HPLC, se prepara la siguiente muestra.

El volumen de inyección es de 20 µl por defecto, pero puede cambiarse en caso necesario en el punto del programa "19 - INJECT".

El punto del programa "21 - WAIT" sirve para la coordinación temporal de las inyecciones del ASPEC™ a la duración de la cromatografía y los tiempos de preparación de muestras **y deberá adaptarse según corresponda.**

IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT
Ing. Susana Macias
Apoderada
María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

"VMA_H":

Idéntico a "VMA", solo que en este caso se usa HICA como estándar interno adicional para el análisis de 5-HIAA.

El punto de programa "INJECT" es el número 21
El punto de programa "WAIT" para adaptar la duración de la cromatografía es el número #23

"VMA_N" /"V_H_N":

El ASPEC™ realiza la preparación de muestras pero no las inyecta en el sistema de HPLC.

Configuración requerida

Este programa precisa de un teclado para controlar el ASPEC™.

Hay que comprobar las siguientes entradas en el punto de menú CONFIG y en caso necesario adaptarlas a la configuración real del ASPEC™:

Configuration SAMPLER:
Model
Arm
Rinsing station depth: por lo general 80 mm
Rinsing station positions: A y/o B, C
Injection loop(s): posición y volumen
Calib. tubing volume
ID number

Configuration DILUTOR:
Tipo
Left syringe volume
Right syringe volume
Transfer tubing
ID number

JENCK S.A.
Susana Macias
Apoderada

María Cristina Vescin
Farmacéutica
M.N. 10.370

IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT

Apéndice II: 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 pedírnoslas.

Tabla 15: Indicaciones de peligro y consejos de prudencia

Pictogramas	Indicaciones de peligro y consejos de prudencia
Mobile Phase (n° de pedido 1011, 1012)	
	Atención H302+H312+H332 Nocivo en caso de ingestión, contacto con la piel o inhalación. H371 Puede provocar daños en los órganos.
	P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. P302+P352 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua y jabón. P301+P312 EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico si la persona se encuentra mal. P403+P233 Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener el recipiente cerrado herméticamente.
Elution Buffer (n° de pedido 1077)	
	Atención H315 Provoca irritación cutánea. H319 Provoca irritación ocular grave.
	P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. P305+P351+P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.
Finisher (n° de pedido 1013)	
	Peligro H290 Puede ser corrosivo para los metales. H314 Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.
	P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. P305+P351+P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. P309+P311 EN CASO DE exposición o si se encuentra mal: Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico. P301+P330+P331 EN CASO DE INGESTIÓN: Enjuagarse la boca. NO provocar el vómito.

JE-2021-33127599-APN-DGA#ANMAT
Ing. Susana Macias
Apoderada
María Cristina Vescin
Farmacéutica
M.N. 10.370

Pictogramas Indicaciones de peligro y consejos de prudencia

Estos elementos han sido clasificados como no peligrosos acorde a la legislación de la Unión Europea:

Calibration Standard (n° de pedido 1003/B)
Urine Calibration Standard (n° de pedido 1009)
Internal Standard (n° de pedido 1004/B)
Wash Buffer I (n° de pedido1005)
Wash Buffer II (n° de pedido1006)
Internal Standard (HICA) (n° de pedido 51303/B)
Potential Optimisation Mix (n° de pedido 1099)
Endocrine Urine Controls (n° de pedido 0040, 0050)

Apéndice III: Cálculo manual

Para el cálculo manual se necesitan los siguientes datos:

Área o altura de pico de:	Denominación
Analito A (p.ej.:VMA) en el cromatograma de la muestra.	$A_{Muestra}$
Analito A (p.ej.:VMA) en el cromatograma del estándar de calibración.	$A_{Estándar}$
Estándar interno IS (p.ej.: iso-VMA) en el cromatograma de la muestra	$IS_{Muestra}$
Estándar interno IS (p.ej.: iso-VMA) en el cromatograma del estándar de calibración.	$IS_{Estándar}$

Fórmula de cálculo:

$$\text{Concentración del analito A en la muestra (en mg/l)} = \frac{A_{Muestra} \times IS_{Estándar}}{IS_{Muestra} \times A_{Estándar}} \times \text{factor} \times 40$$

Factores para la fórmula de cálculo anterior:

VMA:	0,25
5-HIAA:	0,25
HVA:	0,25
HICA:	0,25

Cálculo de la recuperación:

$$\text{Producto} = \frac{\text{Área del pico de Iso-VMA en el cromatograma de la muestra}}{\text{Área del pico de Iso-VMA en el cromatograma del estándar de calibración}} \times 100$$

Requisito para el cálculo cuantitativo del 5-HIAA es una recuperación superior al 50 %. La precisión del análisis de 5-HIAA aumenta utilizando HICA como estándar interno (ver Cap. 5.5.2).

Ing. Susana Macias
Apoderada

María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT

Apéndice IV: Datos de rendimiento

Dentro del marco de la prueba de linealidad y de la validación, se añadieron a las muestras de orina cantidades definidas de VMA, HVA y 5-HIAA y se procesaron varias veces.

Tasas de recuperación:
La tasa de recuperación analítica se determinó a partir de la pendiente de las curvas de calibración, mediante adiciones estándar, de varias muestras de orina y diluciones acuosas:

Tabla 16: Tasas de recuperación

Sustancia	Tasa de recuperación
VMA	70 %
HVA	82 %
5-HIAA	66 %
Estándar interno (iso-VMA)	78 %
Estándar interno (HICA)	72 %

Linealidad y límite de cuantificación del análisis (LLOQ):
El método es lineal desde el límite inferior (LLOQ) hasta el límite superior de análisis indicado (rango lineal).

Tabla 17: Linealidad y límite de cuantificación del análisis

Sustancia	Límite inferior de cuantificación (LLOQ), aprox.*	Rango lineal hasta por lo menos
VMA	0,2 mg/l	78 mg/l
HVA	0,2 mg/l	51 mg/l
5-HIAA	0,2 mg/l	76 mg/l

*Los límites del análisis dependen del estado del electrodo de trabajo empleado.

Reproducibilidad Intra-ensayo:
Los coeficientes de variación se calcularon para 3 concentraciones diferentes, procesando varias veces (n = 10) la misma muestra en una secuencia:

Tabla 18: Reproducibilidad Intra-ensayo

Sustancia	Coeficiente de variación (concentración de sustancia)		
	n = 10	n = 10	n = 10
VMA	0,6 % (4,56 mg/l)	0,8 % (16,0 mg/l)	1,3 % (9,79 mg/l)
HVA	1,1 % (4,49 mg/l)	1,0 % (13,5 mg/l)	1,3 % (8,98 mg/l)
5-HIAA	3,8 % (3,34 mg/l)	1,7 % (11,4 mg/l)	3,0 % (6,84 mg/l)

JENCK S.A.
Ing. Susana Macias
Apoderada

IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT

María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

Reproducibilidad Inter-ensayo:
El análisis de la reproducibilidad Inter-ensayo se realizó mediante un procesamiento cuádruple y una medición de las concentraciones de analitos en dos controles de orina en 20 series diferentes:

Tabla 19: Reproducibilidad Inter-ensayo

Sustancia	Coeficiente de variación (concentración de sustancia)	
	n = 80	n = 80
VMA	2,1 % (4,51 mg/l)	2,0 % (15,5 mg/l)
HVA	1,9 % (4,38 mg/l)	1,8 % (13,1 mg/l)
5-HIAA	4,5 % (3,98 mg/l)	4,2 % (12,3 mg/l)

JENCK S.A.
Ing. Susana Macias
Apoderada

IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT

María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

CHROMSYSTEMS
DIAGNOSTICS BY HPLC & LC-MS/MS

EC-Declaration of Conformity

according to directive 98/79 EC on in vitro diagnostic medical devices

We, as manufacturer

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
Am Haag 12
82166 Gräfelfing, Germany

declare on our own responsibility, that herein after called in vitro diagnostic medical devices for the HPLC determination of:

GMDN Code 60606, term "HVA/VMA/5HIAA IVD, kit, liquid chromatography"

EDMA Nomenclature term: Vanillylmandelic acid
EDMA Nomenclature code: 12-09-02-17-00
IVDD Classification: *other product*

Reagent Kit: **1000/B – VMA, HVA und 5-HIAA in Urine**
Calibrators: **1009 – Urine Calibration Standard**
1003/B – Calibration Standard
Controls: **0040 – Endocrine Urine Control, Normal Range**
0050 – Endocrine Urine Control, Pathological Range

meet all applicable requirements of the directive 98/79/EC.

Conformity assessment procedure: Annex III of the directive 98/79/EC

Applied harmonized standards:
EN ISO 13485, EN 13612, EN 13641, EN ISO 14971, EN 18113-1, EN 18113-2, EN 15223-1, EN 17511, EN 23640

Notified body: –

Gräfelfing, April 11th, 2019

Michael Meier
Managing Director

EC declaration valid until May 26th, 2022

Vers. 3.0

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
Am Haag 12
82166 Gräfelfing/Germany
Telefon: +49 89 18930-0
Telefax: +49 89 18930-199
mailbox@chromsystems.com
www.chromsystems.com

Managementsystem zertifiziert nach:
DIN EN ISO 9001, DIN EN ISO 13485, ISO 13485 CMDR

IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT

BENCK S.A.
Ing. Susana Macias
Apoderada

María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

Apéndice VI: 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 20: Símbolos

Símbolo	Significado
	Fabricante
	Fecha de fabricación
	Fecha de caducidad
REF	Número de artículo
LOT	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
IVD	Diagnóstico *in vitro*
Σ	Suficiente para <n> pruebas
SN	Número de serie

JENCK S.A.
Ing. Susana Tacchos
Apoderada

María Cristina Vescina
Farmacéutica
M.N. 10.370

IF-2021-03197599-APN-DGA#ANMAT

República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
2021 - Año de Homenaje al Premio Nobel de Medicina Dr. César Milstein

Hoja Adicional de Firmas
Informe gráfico

Número: IF-2021-93127599-APN-DGA#ANMAT

CIUDAD DE BUENOS AIRES
Jueves 30 de Septiembre de 2021

Referencia: RÓTULOS Y MANUAL DE INSTRUCCIONES

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 45 pagina/s.

Digitally signed by Gestion Documental Electronica
Date: 2021.09.30 18:08:23 -03:00

CECILIA CONSTANZA SCHIUMA
Técnico Profesional
Dirección General de Administración
Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica

Digitally signed by Gestion Documental Electronica
Date: 2021.09.30 18:08:25 -03:00

República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
2021 - Año de Homenaje al Premio Nobel de Medicina Dr. César Milstein

Certificado - Redacción libre

Número: CE-2021-116937892-APN-ANMAT#MS

CIUDAD DE BUENOS AIRES
Jueves 2 de Diciembre de 2021

Referencia: EX-2020-87839131-APN-DGA#ANMAT

CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN E INSCRIPCIÓN

PRODUCTOS PARA DIAGNÓSTICO DE USO IN VITRO

Nº EX-2020-87839131-APN-DGA#ANMAT

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) certifica que de acuerdo con lo solicitado por la firma JENCK S.A. se autoriza la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM), de nuevos productos médicos para diagnóstico de uso in vitro con los siguientes datos:

NOMBRE COMERCIAL: 1) 1000/B VMA, HVA and 5-HIAA in urine; 2)

1011 Mobile Phase; 3) 1003/B Calibration Standard; 4) 1009 Urine Calibration Standard; 5) 1004/B Internal Standard; 6) 1005 Wash Buffer I; 7) 1006 Wash Buffer II; 8) 1077 Elution Buffer; 9) 1013 Finisher; 10) 1008 Sample Clean Up Columns.

INDICACIÓN DE USO: 1) VMA, HVA and 5-HIAA in urine es un kit de reactivos diseñado para el análisis de ácido vainillinmandélico, ácido homovanílico y ácido-5 hidroxiindolacético en orina por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Antes de la separación cromatográfica estos analitos se aíslan fácilmente de la matriz de la orina utilizando una columna de intercambio iónico en el proceso de preparación de muestras; 2) a 10) reactivos utilizados para el análisis de ácido vainillinmandélico, ácido homovanílico y ácido-5 hidroxiindolacético en orina por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

FORMA DE PRESENTACIÓN: 1) Envases por 100 determinaciones, conteniendo: Mobile Phase 1 x 1000 mL, Calibration Standard 5 x 1.0 mL, Internal Standard 1 x 100 mL, Wash Buffer I 1 x 300 mL, Wash Buffer II 2 x 300 mL, Elution Buffer 1 x 200 mL, Finisher x 10 mL, Sample Clean Up Columns 2 x 50 unidades; 2) Mobile Phase 1 x 1000 mL; 3) Calibration Standard 5 x 1.0 mL; 4) Urine Calibration Standard 5 x 5.0 mL; 5) Internal

Standard 1 x 100 mL; 6) Wash Buffer I 1 x 300 mL; 7) Wash Buffer II 1 x 300 mL; 8) Elution Buffer 1 x 200 mL; 9) Finisher 1 x 10 mL; y 10) Sample Clean Up Columns 1 x 50 unidades.

PERIODO DE VIDA ÚTIL Y CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 1), 3), 4) y 5): 36 (TREINTA Y SEIS) meses desde la fecha de elaboración conservado entre 2 y 8ºC; y 2), 6), 7), 8), 9) y 10): 36 (TREINTA Y SEIS) meses desde la fecha de elaboración conservado entre 18 y 30ºC.

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL FABRICANTE: Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, Am Haag 12, 82166 Gräfelfing (ALEMANIA).

CONDICIÓN DE VENTA/CATEGORÍA: Venta a Laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO.

Se extiende el presente Certificado de Autorización e Inscripción del **PRODUCTO PARA DIAGNÓSTICO USO IN VITRO PM Nº 2188-1**.

Nº EX-2020-87839131-APN-DGA#ANMAT

AM

Digitally signed by Gestion Documental Electronica
Date: 2021.12.02 00:12:24 -03:00

Valeria Teresa Garay
Subadministradora Nacional
Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica

Digitally signed by Gestion Documental Electronica
Date: 2021.12.02 00:12:24 -03:00