

METANEFRINE LIBERE PLASMATICHE in LC/MS

Codice LC97110

Metabolismo delle catecolamine biogene e formazione dei rispettivi metaboliti

Le catecolamine sono composti organici diidrossilati caratterizzati da un anello fenolico di tipo catecolico (diidrossibenzene).

I membri più importanti di questa famiglia sono: **ADRENALINA**, **NORADRENALINA**, **DOPAMINA**. La sintesi delle catecolamine avviene attraverso una serie di reazioni enzimatiche che utilizzano come substrato iniziale l'aminoacido aromatico **L-TIROSINA** (fig. 1) e tale formazione ha luogo nelle cellule cromaffini della midollare surrenale e dei neuroni simpatici.

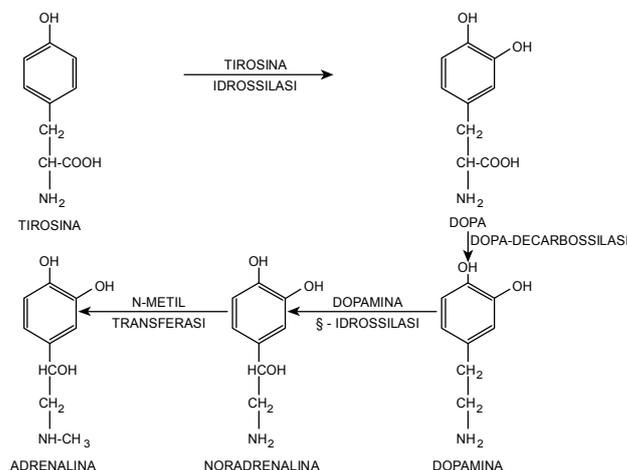


Figura 1: Biosintesi delle catecolamine

CATABOLISMO

Il catabolismo delle monoamine è in parte neuronale ed avviene nei mitocondri ad opera delle **MonoAminoOssidasi (MAO)** e in parte extraneuronale per le catecolamine, ad opera della **CatecolaminaOrtoMetiltransferasi (COMT)**.

In particolare:

- dalla **DOPAMINA** per azione delle MAO si ha l'**Acido Diidrossifenilacetico (DOPAC)** il quale per azione della COMT viene trasformato in **Acido Omovanillico (HVA)**.
- dalla **NORADRENALINA** e dall'**ADRENALINA** si origina invece per azione delle MAO, l'aldeide 3,4-Diidrossimandelica da cui derivano successivamente il 3,4-Diidrossifenilglicole (DHPG) e il 3-Metossi-4-idrossifenilglicole (MHPG) .
- Esiste alternativamente un'altra via metabolica che le trasforma in **Acido 3,4 - Diidrossimandelico** da cui per azione della COMT si ha la sintesi di **Acido Vanilmandelico (VMA)**.

L'Acido Omovanillico è il principale catabolita della **DOPAMINA** mentre l'**Acido Vanilmandelico** rappresenta il principale catabolita di **NORADRENALINA** e di **ADRENALINA** (fig. 2).

EUREKA srl – LAB DIVISION
VAT N° 01547310423
E-mail: info@eurekaone.com
www.eurekaone.com



Head Quarter:
Via Enrico Fermi 25
60033 Chiaravalle (AN) ITALY
Tel. +39 071 7450790
Fax + 39 071 7496579



Questo prodotto adempie a tutte le esigenze della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD). La dichiarazione di conformità CE è disponibile su richiesta.

| | | |
|-------------|----------------------------------|-------------|
| Rev. N° 001 | Metanefrine plasmatiche in LC/MS | Luglio 2019 |
|-------------|----------------------------------|-------------|

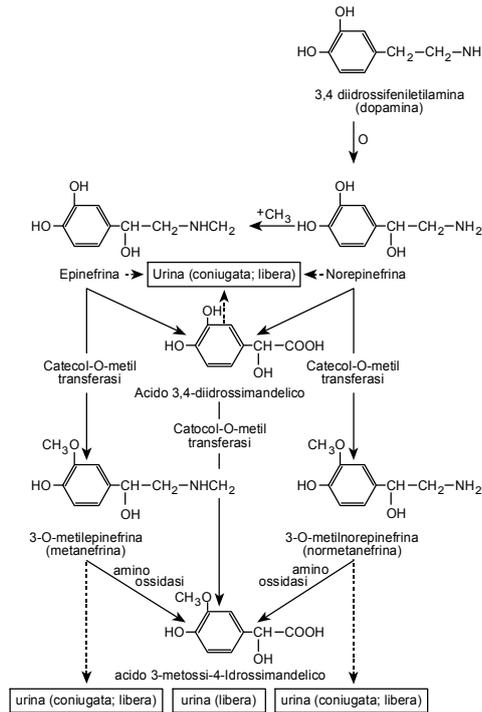


Figura 2: Metabolismo degli omoni della midollare del surrene

PATOLOGIA

La patologia specifica è rappresentata da: **FEOCROMOCITOMA, PARAGANGLIOMA, NEUROBLASTOMA.**

Il **FEOCROMOCITOMA** è un tumore che spesso si manifesta in soggetti caratterizzati da forte ipertensione (1/1000 soggetti ipertesi), di non elevata malignità (< 5%) e si riscontra nel 90% dei casi in sede surrenalica e nel 10% in sede extrasurrenalica dove prende il nome di **PARAGANGLIOMA**. Le sedi extrasurrenaliche più frequenti sono l'organo di Zuckerkandle, gli altri paragangli addominali e la vescica. Può essere unico nel 90% dei casi e multiplo nel 10%; inoltre nel 90% dei casi è di tipo occasionale e su base familiare nel restante 10%: talvolta coinvolge entrambe le surreni (bilaterale) e spesso è associato a carcinoma midollare tiroideo (adenomatosi endocrina multipla di tipo II). La malignità si riscontra nel 10% dei casi.

Il **NEUROBLASTOMA** deriva dai simpatogoni provenienti dalla cresta neurale, dopo trasformazione in neuroblasti. Si tratta di tumori immaturi e maligni, localizzati nella midollare o nei gangli simpatici. Producono Catecolamine e loro metaboliti; caratteristicamente si rileva un aumento di **DOPAMINA** e naturalmente di **Acido Omovanillico**. Mentre il sospetto clinico è soprattutto anamnestico, la conferma è solo laboratoristica, mediante l'accertamento di aumentati livelli di catecolamine e/o dei loro metaboliti nel plasma e/o nelle urine. La determinazione delle Catecolamine nel plasma assume particolare rilevanza sul prelievo effettuato in corso di crisi.

Caratteristiche Tecniche

Principio del Metodo:

Il campione plasmatico viene trattato con estrazione SPE e iniettato in LC-MS/MS.

Recupero :

>98 %

Valori di Normalità:

METANEFrina 0.08-0.51 nmol/L
NORMETANEFrina 0.12-1.18 nmol/L
3-METOSSITIRAMINA < 0.18nmol/L

Sensibilità analitica (LLOD) :

Metanefrina 1,0 ng/L
Normetanefrina 5,0 ng/L
3-Metossitiramina 5,0 ng/L

Minima concentrazione analizzabile (LLOQ) :

Metanefrina 5,0 ng/L
Normetanefrina 15,0 ng/L
3-Metossitiramina 15,0 ng/L

Linearità :

Metanefrina 5,0 – 5.000 ng/L
Normetanefrina 15,0 – 5.000 ng/L
3-Metossitiramina 15,0 – 5.000 ng/L

Accuratezza intra serie (errore relativo %)

Metanefrina:

| Ci | Cs |
|----------|----------|
| 100 ng/l | 500 ng/l |
| 8,24% | 7,98% |

Accuratezza inter serie (errore relativo %)

Metanefrina:

| Ci | Cs |
|----------|----------|
| 100 ng/l | 500 ng/l |
| 10,82% | 5,87% |

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %)

Metanefrina:

| C LLOQ | Cm | CUP |
|----------|----------|-----------|
| 5,0 ng/l | 250 ng/l | 1000 ng/l |
| 3,43% | 4,87% | 1,09% |

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %)

Metanefrina:

| C LLOQ | Cm | CUP |
|----------|-----------|------------|
| 7,2 ng/l | 62,9 ng/l | 115,1 ng/l |
| 5,93% | 7,36% | 2,42% |

Accuratezza intra serie (errore relativo %)

Normetanefrina:

| Ci | Cs |
|----------|----------|
| 100 ng/l | 500 ng/l |
| 6,31% | 1,45% |

Accuratezza inter serie (errore relativo %)

Normetanefrina:

| Ci | Cs |
|----------|----------|
| 100 ng/l | 500 ng/l |
| 8,84% | 1,93% |

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %)
Normetanefrina:

| C LLOQ | Cm | CUP |
|---------------|-----------|------------|
| 15 ng/l | 250 ng/l | 1000 ng/l |
| 7,85% | 5,83% | 1,80% |

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %)
Normetanefrina:

| C LLOQ | Cm | CUP |
|---------------|-----------|------------|
| 7,2 ng/l | 62,9 ng/l | 115,1 ng/l |
| 7,39% | 5,20% | 3,95% |

Accuratezza intra serie (errore relativo %)
3-Metossitiramina:

| Ci | Cs |
|-----------|-----------|
| 100 ng/l | 500 ng/l |
| 12,05% | 0,81% |

Accuratezza inter serie (errore relativo %)
3-Metossitiramina:

| Ci | Cs |
|-----------|-----------|
| 100 ng/l | 500 ng/l |
| 10,93% | 1,76% |

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %)
3-Metossitiramina:

| C LLOQ | Cm | CUP |
|---------------|-----------|------------|
| 15 ng/l | 250 ng/l | 1000 ng/l |
| 7,58% | 4,25% | 1,47% |

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %)
3-Metossitiramina:

| C LLOQ | Cm | CUP |
|---------------|-----------|------------|
| 7,2 ng/l | 62,9 ng/l | 115,1 ng/l |
| 7,89% | 3,53% | 1,52% |

Coefficiente di Correlazione R2 + Dev Std

0,9959 ± 0,0035 Metanefrina
0,9988 ± 0,0008 Normetanefrina
0,9970 ± 0,0005 3-Metossitiramina

| | |
|--|--|
| <u>Contenuto della confezione :</u> | Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a 2–8 °C, eccetto il Reagente A . |
| Reagente A – Soluzione Standard Interno, 1 x 1 ml | Conservare a – 20 °C |
| Reagente B – Soluzione Tampone, 1 x 25 ml | |
| Reagente C – Soluzione di Condizionamento 1, 1 x 20 ml | |
| Reagente D – Soluzione di Condizionamento 2, 1 x 20 ml | |
| Reagente E – Soluzione di Lavaggio 1, 1 x 20 ml | |
| Reagente F – Soluzione di Lavaggio 2, 1 x 20 ml | |
| Reagente G – Soluzione di Eluizione, 1 x 5 ml | |
| Reagente H – Soluzione Diluente, 1 x 5 ml | |
| Calibratore plasmatico – Livello 0, 2 x 1 ml | <u>Codice LC97016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)</u> |
| Calibratore plasmatico – Livello 1, 2 x 1 ml | <u>Codice LC97016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)</u> |
| Calibratore plasmatico – Livello 2, 2 x 1 ml | <u>Codice LC97016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)</u> |
| Calibratore plasmatico – Livello 3, 2 x 1 ml | <u>Codice LC97016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)</u> |
| Calibratore plasmatico – Livello 4, 2 x 1 ml | <u>Codice LC97016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)</u> |
| Calibratore plasmatico – Livello 5, 2 x 1 ml | <u>Codice LC97016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)</u> |
| Calibratore plasmatico – Livello 6, 2 x 1 ml | <u>Codice LC97016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)</u> |
| Reagente M1 – Fase Mobile M1, 1 x 500 ml | |
| Reagente M2 – Fase Mobile M2, 2 x 500 ml | |
| WASH SOLUTION, 2 x 500 ml | |
| Colonne di Clean up, Well Plates 96 | |
| Sealing, Well Plates 96 | |
| Rack di raccolta, Well Plates 96 | |

Strumentazione minima necessaria:

LC-MS/MS Triplo Quadrupolo con pompa binaria
MRM mode, ESI positivo
Software gestionale
Manifold a pressione positiva per la gestione delle micropiastre

Modalità di esecuzione del *prelievo ematico* e *conservazione* del Campione plasmatico:

Stabilizzare il paziente per almeno 10 minuti sulla poltrona di prelievo. Preparare in un piccolo beaker un bagno di acqua/ghiaccio. Prelevare 7 ml di sangue venoso in una provetta contenente EDTA come anticoagulante. Agitare delicatamente per inversione per circa 1 minuto il campione prelevato e porre velocemente la provetta nel bagno di acqua/ghiaccio precedentemente preparato. Centrifugare subito dopo a 3.000 rpm per 3 minuti. Prelevare circa 3 ml di Plasma. Se non si analizza subito, stoccare il campione in congelatore a – 70 °C dove è stabile circa 1 mese.

PROCEDURA ANALITICA

FASE 1 :

PREPARAZIONE DEGLI STANDARD INTERNI

Preparare prima di ogni seduta analitica un volume idoneo in base al numero di campioni (considerare 50 uL a campione)

- 900 uL **Reagente H - Soluzione di Diluizione**
- 100 uL **Reagente A - Soluzione Standard Interno**

FASE 2 :

Preparazione dei Campioni, del Calibratore e dei Controlli

| | Calibratore – Livello 1 | Calibratore – Livello 2 | Calibratore – Livello 3 | Calibratore – Livello 4 | Calibratore – Livello 5 | Campione | Controllo |
|--|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|----------|-----------|
| Reagente B – Soluzione Tampone | 250 µl | 250 µl | 250 µl |
| Calibratore – Livello 1 | 250 µl | | | | | | |
| Calibratore – Livello 2 | | 250 µl | | | | | |
| Calibratore – Livello 3 | | | 250 µl | | | | |
| Calibratore – Livello 4 | | | | 250 µl | | | |
| Calibratore – Livello 5 | | | | | 250 µl | | |
| Campione | | | | | | 250 µl | |
| Controllo | | | | | | | 250 µl |
| Standard interno precedentemente preparata | 50 µl | 50 µl | 50 µl |

Vortex per 10 sec.

FASE 3 : Condizionamento Colonne Clean up:

- Versare in colonna 200 ul di **Reagente C – Sol.di Condizionamento N° 1**
Scartare l'eluato
 - Impostare la pressione a 6 psi ed attendere che le colonnine SPE si svuotino completamente;
- Versare in colonna 200 ul di **Reagente D – Sol.di Condizionamento N° 2**
Scartare l'eluato
 - Impostare la pressione a 6 psi ed attendere che le colonnine SPE si svuotino completamente;

FASE 4 : Caricamento dei Campioni, Calibratore e Controlli

- Versare tutti i Campioni, Calibratore e Controlli precedentemente preparati nelle colonne Clean-up
Scartare l'eluato
 - Impostare la pressione a 6 psi ed attendere ed attendere 5 minuti;
 - Impostare la pressione a 12 psi ed attendere che le colonnine SPE si svuotino completamente;

| | | |
|-------------|----------------------------------|-------------|
| Rev. N° 001 | Metanefrine plasmatiche in LC/MS | Luglio 2019 |
|-------------|----------------------------------|-------------|

FASE 5 : Lavaggio colonne Clean up:

- Versare 200 µl di **Reagente E – Soluzione di Lavaggio N° 1** nelle Colonne di Clean-up
Scartare l'eluato
 - Impostare la pressione a 12 psi ed attendere che le colonnine SPE si svuotino completamente;
- Versare 200 µl di **Reagente F1 – Soluzione di Lavaggio N° 2** nelle Colonne di Clean-up
Scartare l'eluato
 - Impostare la pressione a 12 psi ed attendere che le colonnine SPE si svuotino completamente;
 - Asciugare i tips delle colonnine su carta assorbente;

FASE 6 : Eluizione:

- Eluire con 25 µl di **Reagente G – Soluzione Eluente** *Raccogliere l'eluato*
 - Impostare la pressione a 6 psi ed attendere ed attendere 5 minuti;
 - Impostare la pressione a 12 psi ed attendere che le colonnine SPE si svuotino completamente;
- Eluire con 25 µl di **Reagente G – Soluzione Eluente** *Raccogliere l'eluato*
 - Impostare la pressione a 6 psi ed attendere ed attendere 5 minuti;
 - Impostare la pressione a 12 psi ed attendere che le colonnine SPE si svuotino completamente;
- Chiudere il rack di raccolta con l'apposito coperchio

N.B: il campione così preparato è stabile 1 giorno a 2-8 °C

INIEZIONE

- Iniettare 2-10 µl dell'eluato nel sistema cromatografico.

| | | |
|-------------|----------------------------------|-------------|
| Rev. N° 001 | Metanefrine plasmatiche in LC/MS | Luglio 2019 |
|-------------|----------------------------------|-------------|

METANEFRINE - Avvertenze

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica nuova ACQUITY UPLC BEH (100 x 2,1 mm, 1,7 µm), termostata a 30 °C. Disconnettere il detector Fluorimetrico e far passare la **WASH SOLUTION** al flusso di 600 µl / minuto per 15 minuti. **Non riciclare i liquidi di lavaggio**. Condizionare la colonna con la fase mobile M2 al flusso di 600 µl / minuto per 15 minuti. **Due iniezioni di 50%Acqua / 50% metanolo di grado HPLC prima di procedere alle serie analitiche.**

NON è possibile fare analisi a ricircolo di fase.

Se la T Amb del Laboratorio è > 20 °C si consiglia di conservare a 2-8 °C la Fase Mobile fra una seduta analitica e l'altra.

PULIZIA DELLA COLONNA

Lavare con la **WASH SOLUTION** al flusso di 600 µl / minuto per 15 minuti. La colonna va stoccata in questa soluzione. Non far fluire per nessun motivo una percentuale di acqua maggiore del 40% in colonna analitica.

LAVAGGIO DELL'AGO DI INIEZIONE

Lavare con la **WASH SOLUTION**

PARAMETRI SETTATI SU WATERS XEVO TQS MICRO

| | |
|------------------------------|------|
| Capillary Voltage | 0.4 |
| Desolvation Gas (L/ora) | 1000 |
| Cone Gas(L/ora) | 0 |
| Desolvation Temperature (°C) | 500 |
| Source Temperature(°C) | 150 |

Frammentazioni (ottimizzate su TRIPLO QUADRUPOLO WATERS XEVO TQS MICRO)

| Analita | Transizioni MRM m/z | ENERGIA DI COLLISIONE |
|-------------------|----------------------------|------------------------------|
| 3-Metossitiramina | 168.1>91 | 24 |
| | 168.1>119 | 18 |
| Metanefrina | 198.1>180 | 8 |
| | 198.1>165.1 | 18 |
| Normetanefrina | 184.1>166 | 8 |
| | 184.1>134.1 | 18 |

SETTAGGIO DELGRADIENTE

| Tempo (min) | % M1 (POMPA A) | % M2 (POMPA B) | FLUSSO (µl/min) |
|--------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| 0 | 0 | 100 | 600 |
| 1.0 | 0 | 100 | 600 |
| 2.0 | 10 | 90 | 600 |
| 2.1 | 10 | 90 | 1000 |
| 2.5 | 30 | 70 | 1000 |
| 2.6 | 0 | 100 | 1000 |
| 3.9 | 0 | 100 | 1000 |
| 4.0 | 0 | 100 | 600 |

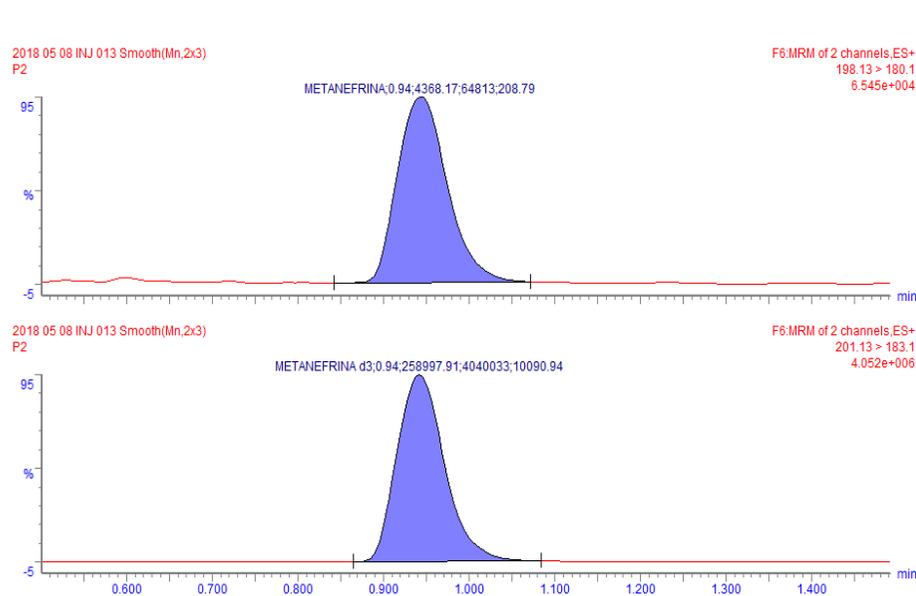
ACCESSORIE E CONSUMABILI

| CODICE | DESCRIZIONE | CONFEZIONE |
|-------------------|---|-------------------|
| LC97016 | Calibratore liofilo in plasma per Catecolamine/Metanefrine | 6 x 2 x 1 ml |
| LC97017 | Controllo liofilo in plasma per Amine Biogeniche, Livello 1 | 5 x 1 ml |
| LC97018 | Controllo liofilo in plasma per Amine Biogeniche, Livello 2 | 5 x 1 ml |
| LC97019 | Controllo liofilo in plasma per Amine Biogeniche, Livelli 1 e 2 | 2 x 5 x 1 ml |
| SK97110 | Starter kit per Metanefrine | 1 Pz |
| S186004801 | Colonna analitica ACQUITY UPLC BEH (100 x 2,1 mm, 1,7 um) | 1 Pz |

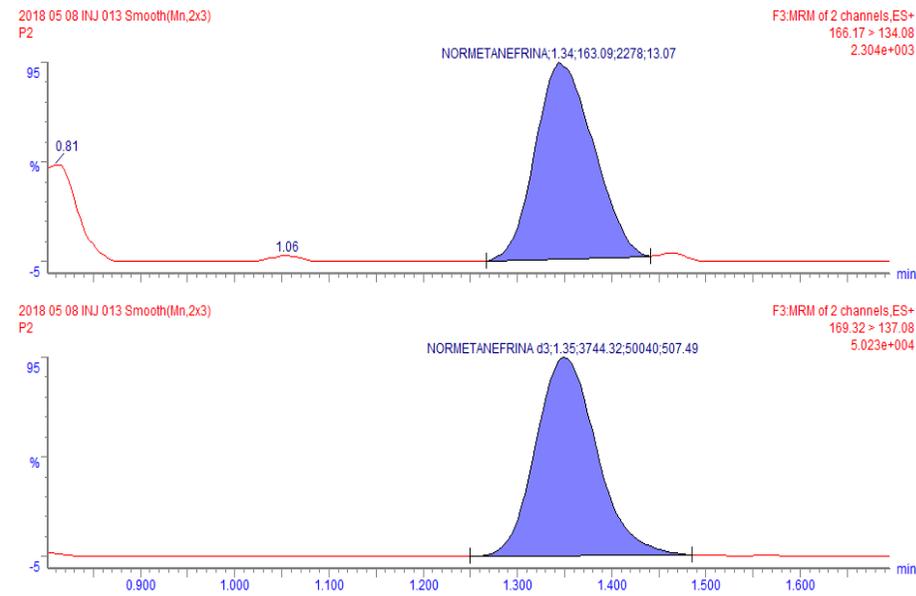
Indice Riferimenti Bibliografici

1. Eisenhofer G: Free or total metanephrines for diagnosis of pheochromocytoma: what is the difference? Clin Chem 2001 June;47(6):988-989
2. Lenders JW, Pacek K, Walther MM, et al: Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: which test is best? JAMA 2002 Mar 20;287(11):1427-1434
3. Sawka AM, Jaeschke R, Singh RJ, Young WF Jr: A comparison of biochemical tests for pheochromocytoma: measurement of fractionated plasma metanephrines compared to the combination of 24-hour urinary metanephrines and catecholamines. J Clin Endocrinol Metab 2003 Feb;88(2):553-558
4. Algeciras-Schimmich A, Preissner CM, Young WF Jr, et al: Plasma chromogranin A or urine fractionated metanephrines follow-up testing improves the diagnostic accuracy of plasma fractionated metanephrines for pheochromocytoma. J Clin Endocrinol Metab Oct 16, 2007;doi:doi:10.1210/jc.2007-1354
5. Young WF Jr: Pheochromocytoma and primary aldosteronism. In Endocrine Neoplasms. Edited by A Arnold. Boston, Kluwer Academic Publishers, 1997, pp 239-261
6. Hernandez FC, Sanchez M, Alvarez A, et al: A five-year report on experience in the detection of pheochromocytoma. Ann Intern Med 2000;33:649-655
7. Pacak K, Linehan WM, Eisenhofer G, et al: Recent advances in genetics, diagnosis, localization, and treatment of pheochromocytoma. Ann Intern Med 2001;134:315-329
8. Alexander F: Neuroblastoma. Urol Clin North Am 2000;27:383-392
9. McDougall AJ, McLeod JG: Autonomic neuropathy, I. Clinical features, investigation, pathophysiology, and treatment. J Neurol Sci 1996;137:79-88
10. Lenders JW, Pacak K, Walther MM, et al: Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: which test is best? JAMA 2002;287:1427-1434
11. Peaston RT, Graham KS, Chambers E, van der Molen JC, Ball S, Performance of plasma free metanephrines measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the diagnosis of pheochromocytoma. Clin Chim Acta 2010; 411:546-552

METANEFRINE PLASMATICHE IN LC/MS (Cromatogrammi di riferimento)

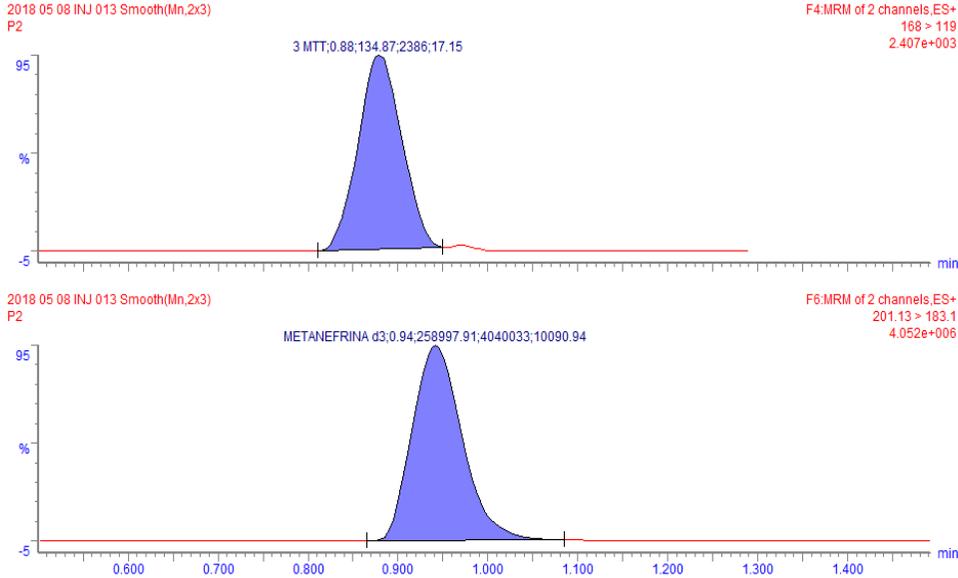


| | | | |
|-----------------|-------------------------------|----------------|----------|
| Fig. 3 : | Calibratore plasmatico | | |
| | R.T. 0.94 | Metanefrina | 250 ng/L |
| | R.T. 0.94 | Metanefrina-D3 | 250 ng/L |



| | | | |
|-----------------|-------------------------------|-------------------|----------|
| Fig. 4 : | Calibratore plasmatico | | |
| | R.T. 1.34 | Normetanefrina | 250 ng/L |
| | R.T. 1.35 | Normetanefrina-D3 | 250 ng/L |

METANEFRINE PLASMATICHE IN LC/MS
(Cromatogrammi di riferimento)



| | | | |
|-----------------|-------------------------------|-------------------|----------|
| Fig. 5 : | Calibratore plasmatico | | |
| | R.T. 0.88 | 3-Metossitiramina | 250 ng/L |
| | R.T. 0.94 | Metanefrina-D3 | 250 ng/L |